GeneXpert®
Powered By CEPHEID INNOVATION

Xpert® Flu

REF GXFLU-CE-10

Cepheid®

In Vitro Diagnostic Medical Device

CE IVD

300-8906 Rev. C, February 2011

Cepheid
904 Caribbean Drive
Sunnyvale, CA 94089-1189
Tel: (408) 541-4191
Fax: (408) 541-4192
Technical Support toll-free: (888) 838-3222

EC REP
Cepheid Europe
Vira-Solelh
81470 Maurens-Scopont - France
Tel: +33 5 63 82 53 00
Fax: +33 5 63 82 53 01
Technical Support: +33 5 63 82 53 19

English

For *In Vitro* Diagnostic Use Only

Proprietary Name

Xpert® Flu

Common or Usual Name

Xpert Flu Assay

Intended Use

The Cepheid® Xpert Flu Assay is an automated, multiplex real-time RT-PCR assay intended for the *in vitro* qualitative detection and differentiation of Influenza A, Influenza B and 2009 H1N1 influenza viral RNA. The Xpert Flu Assay uses nasal aspirates/washes and nasopharyngeal swab specimens collected from patients with signs and symptoms of respiratory infection in conjunction with clinical and epidemiological risk factors. The Xpert Flu Assay is intended as an aid in the diagnosis of influenza.

Summary and Explanation

Influenza, or the flu, is a contagious viral infection of the respiratory tract, which often occurs in the winter. Transmission of influenza is primarily airborne (i.e., coughing or sneezing). Symptoms commonly include fever, chills, headache, malaise, cough and sinus congestion. Gastrointestinal symptoms (i.e., nausea, vomiting or diarrhea) may also occur, primarily in children, but are less common. Symptoms generally appear within two days of exposure to an infected individual. Pneumonia may develop as a complication after an influenza infection, causing increased morbidity and mortality in pediatric, elderly and immunocompromised populations.[1,2]

Influenza viruses are classified into types A, B, and C, the first two of which cause the most human infections. Influenza A is the most common type of influenza virus in humans, and is generally responsible for seasonal flu epidemics and potentially can cause pandemics. Influenza A viruses can also infect animals such as birds, pigs, and horses. Infections with Influenza B virus are generally restricted to humans and cause epidemics more rarely. Influenza A viruses are further divided into subtypes on the basis of two surface proteins: hemagglutinin (H) and neuraminidase (N). Seasonal flu is normally caused by combinations of subtypes H1, H2, H3, N1 and N2. In addition to already circulating seasonal flu viruses, a novel H1N1 strain was identified in humans in early 2009.[3]

Active surveillance programs in conjunction with infection control precautions are important components for preventing transmission of influenza. The use of assays that provide rapid results to identify and differentiate the infecting agent in patients infected with seasonal and 2009 H1N1 flu is also an important factor for effective control, proper choice of treatment, and prevention of widespread outbreaks of influenza.

Principle of the Procedure

The Xpert Flu Assay is a rapid, automated *in vitro* diagnostic test for qualitative detection of Influenza A, Influenza B, and Influenza A subtype 2009 H1N1. The assay is performed on Cepheid GeneXpert® Dx Systems.

The GeneXpert Dx Systems automate and integrate sample purification, nucleic acid amplification, and detection of the target sequence in simple or complex samples using real-time RT-PCR and PCR assays. The system consists of an instrument, personal computer, and preloaded software for running tests and viewing the results. The systems require the use of single-use disposable GeneXpert cartridges that hold the RT-PCR and PCR reagents and host the RT-PCR and PCR processes. Because the cartridges are self-contained, cross-contamination between samples is minimized. For a full description of the systems, refer to the appropriate *GeneXpert Dx System Operator Manual*.

The Xpert Flu Assay includes reagents for the detection and differentiation of Influenza A, Influenza B, and Influenza A subtype 2009 H1N1 directly from nasal aspirates/washes (NA/W) and nasopharyngeal (NP) swab specimens of patients suspected of having influenza. A Sample Processing Control (SPC) and a Probe Check Control (PCC) are also included in the cartridge. The SPC is present to control for adequate processing of the target viruses and to monitor the presence of inhibitors in the PCR reaction. The Probe Check Control (PCC) verifies reagent rehydration, PCR tube filling in the cartridge, probe integrity, and dye stability.

Reagents and Instruments

Material Provided

Σ The Xpert Flu Assay kit contains sufficient reagents to process 10 specimens or quality control samples. The kit contains the following:

• **Xpert Flu Assay Cartridges with integrated reaction tubes**	**10**
• **Bead 1 (freeze-dried)**	**1 per cartridge**
- Reverse Transcriptase enzyme	
- Taq Polymerase enzyme	
- dNTPs	
- Probe	
- BSA (bovine serum albumin)	
- Salts	
• **Bead 2 (freeze-dried)**	**1 per cartridge**
- Primers	
- Probes	
- dNTPs	
- BSA (bovine serum albumin)	
- Salts	
• **Bead 3 (freeze-dried)**	**1 per cartridge**
- Sample Processing Control (SPC) non-infectious sample preparation control Armored RNA®	
• **Lysis Reagent**	**2.0 mL per cartridge**
- Guanidine Hydrochloride, surfactants	
• **Wash Reagent**	**0.5 mL per cartridge**
- PEG, Monothioglycerol, KCl, Tris Buffer, EDTA, surfactants, sodium azide	
• **Elution Reagent**	**2.0 mL per cartridge**
- Tris-EDTA Buffer, Tween 20	
Σ • **Xpert Flu Assay reagent pouch**	**1 per kit**
• **Binding Reagent**	**10 x 1.0 mL per ampoule**
- water, Ethanol	
• **Disposable 300 µL Transfer Pipettes**	**2 bags of 12 per kit**
• **CD**	**1 per kit**
- Assay Definition File (ADF)	
- Instructions to import ADF into GX software	
- Package Insert	

Notes:

- Material Safety Data Sheets (MSDS) for all reagents provided with this assay are available upon request from Cepheid Technical Support or by visiting http://www.cepheid.com/tests-and-regeants/literature/msds/.
- The bovine serum albumin (BSA) in this product was produced exclusively from bovine plasma sourced in the United States. The manufacturing of the BSA is also performed in the United States. No ruminant protein or other animal protein was fed to the animals; the animals passed ante- and post-mortem testing. During processing, there was no commingling of the material with other animal materials.

Storage and Handling

- Store the Xpert Flu Assay cartridges and reagents at 2–28 °C.
- Do not open a cartridge until you are ready to perform testing.
- Do not use any reagents that have become cloudy or discolored.
- Do not use a cartridge that has leaked.

Materials Required but Not Provided

- GeneXpert Dx System (catalog number varies by configuration): GeneXpert instrument, computer with proprietary software, barcode scanner and Operator Manual
- Printer (See *GeneXpert Dx System Operator Manual* for compatibility guidelines)

Materials Available but Not Provided

- Nasal Collection Kit, Cepheid catalog #NASL-100N-100.
- Inactivated virus controls from ZeptoMetrix, catalog # NATFLUA/B-6MC and catalog # NATFLUAH1N1-MC as external positive controls, and catalog # NATCXVA9-MC (Coxsackie virus) as an external negative control.

Warnings and Precautions

- Treat all biological specimens, including used cartridges, as if capable of transmitting infectious agents. Because it is often impossible to know which might be infectious, all biological specimens should be treated with universal precautions. Guidelines for specimen handling are available from the U.S. Centers for Disease Control and Prevention[4,5] and the Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly National Committee for Clinical Laboratory Standards)[6].
- Follow your institution's safety procedures for working with chemicals and handling biological samples.
- Do not substitute Xpert Flu Assay reagents with other reagents.
- Do not open the Xpert Flu Assay cartridge lid except when adding sample and reagent.
- Do not use a cartridge that has been dropped or shaken after you have added the sample and reagent.
- Do not use a cartridge that has a damaged reaction tube.
- Each single-use Xpert Flu Assay cartridge is used to process one test. Do not reuse spent cartridges.
- Consult your institution's environmental waste personnel on proper disposal of used cartridges and unused reagents. This material may exhibit characteristics of federal EPA Resource Conservation and Recovery Act (RCRA) hazardous waste requiring specific disposal requirements. Check state and local regulations as they may differ from federal disposal regulations. Institutions outside the USA should check their country hazardous waste disposal requirements.
- Store the Xpert Flu Assay kit at 2–28 °C.
- Do not open a cartridge package until you are ready to perform testing.

Specimen Collection, Transport and Storage

NA/W or NP swab specimens can be collected following the user institution's standard procedures and placed into Universal Transport Medium (3 mL UTM tubes).

Samples should be transported at 2–8 °C. Samples can be stored for up to 72 hours at 2–8 °C before processing.

Procedure

Preparing the Cartridge

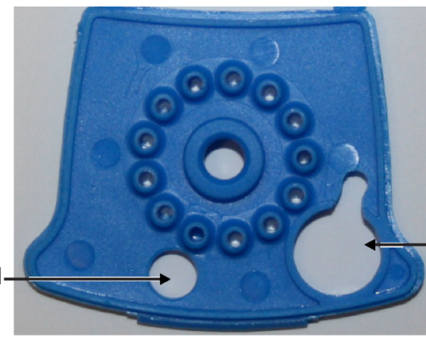
Important: Start the test within 60 minutes of adding the sample and reagent to the cartridge.

For NP swab specimens

1. Remove the cartridge and reagents from the package.
2. Mix specimen by inverting the UTM tube five times.
3. Open the cartridge lid. Using a clean transfer pipette (supplied), transfer 300 µL of the UTM to the "S" chamber of the cartridge.
4. Dispense Binding Reagent 1 into cartridge chamber 1. Squeeze the ampoule until the entire contents are added to the cartridge.
5. Close the cartridge lid.

For NA/W specimens

1. Using a clean 300 µL transfer pipette (supplied), transfer 600 µL of the sample (by pipetting 300 µL twice) into the 3 mL UTM tube and then cap the tube.
2. Mix specimen by inverting the tube five times.
3. Remove the cartridge and reagents from the package
4. Open the cartridge lid. Using a clean 300 µL transfer pipette (supplied), transfer 300 µL of the diluted specimen to the "S" chamber of the cartridge.
5. Dispense Binding Reagent 1 into cartridge chamber 1. Squeeze the ampoule until the entire contents are added to the cartridge.
6. Close the cartridge lid.



Chamber 1 = Binding Reagent 1, "S" Chamber = Sample

Figure 1. Xpert Flu Assay cartridge (top view)

Starting the Test

Important: Before you start the test, make sure the Xpert Flu Assay definition file is imported into the software. This section lists the basic steps for running the test on the GeneXpert DX Systems. For detailed instructions, see the appropriate *GeneXpert Dx System Operator Manual*.

1. Turn on the computer, and then turn on the GeneXpert Dx instrument.
2. On the Windows® desktop, double-click the GeneXpert Dx shortcut icon.
3. Log on to the GeneXpert Dx System software using your user name and password.
4. In the GeneXpert Dx System window, click **Create Test**. The Scan Cartridge Barcode dialog box appears.
5. Scan the barcode on the Xpert Flu Assay cartridge. The **Create Test** window appears. Using the barcode information, the software automatically fills the boxes for the following fields: Select Assay, Reagent Lot ID, and Cartridge SN.
6. In the **Sample ID** box, scan or type the sample ID. Be sure to type the correct sample ID. The sample ID is associated with the test results and is shown in the **View Results** window and all reports.
7. Click **Start Test**. In the dialog box that appears, type your password.
8. Open the instrument module door with the blinking green light and load the cartridge.
9. Close the door. The test starts and the green light stops blinking. When the test is finished, the light turns off.
10. Wait until the system releases the door lock before opening the module door and removing the cartridge.
11. Dispose of used cartridges in an appropriate specimen waste container according to your institution's standard practices.

Viewing and Printing Results

For detailed instructions on how to view and print the results, see the *GeneXpert Dx System Operator Manual*.

CONTROL

Quality Control

Each test includes a Sample Processing Control (SPC) and Probe Check Control (PCC).

Sample Processing Control (SPC) — Ensures the sample was correctly processed. The SPC is an Armored RNA® in the form of a dry bead that is included in each cartridge to verify adequate processing of the sample virus. The SPC verifies that lysis of influenza virus has occurred if the organism is present and verifies that the specimen processing is adequate. Additionally this control detects specimen-associated inhibition of the RT-PCR and PCR reactions. The SPC should be positive in a negative sample and can be negative or positive in a positive sample. The SPC passes if it meets the validated acceptance criteria.

Probe Check Control (PCC) — Before the start of the PCR reaction, the GeneXpert Dx System measures the fluorescence signal from the probes to monitor bead rehydration, reaction tube filling, probe integrity and dye stability. The PCC passes if it meets the validated acceptance criteria.

External Controls — External controls should be used in accordance with local, state, and federal accrediting organizations' requirements as applicable.

Interpretation of Results

The results are interpreted automatically by the GeneXpert Dx System from measured fluorescent signals and embedded calculation algorithms and are clearly shown in the **View Results** window. The possible results are:

Flu A POSITIVE; 2009 H1N1 NOT DETECTED; Flu B NEGATIVE (Figure 2)

Flu A target RNA detected; 2009 H1N1 RNA not detected; Flu B target RNA not detected.

- The Flu A target has a Ct within the valid range and endpoint above the minimum setting.
- SPC – NA (not applicable); SPC is ignored because the Flu A target amplification may compete with this control.
- Probe Check – PASS; all probe check results pass.

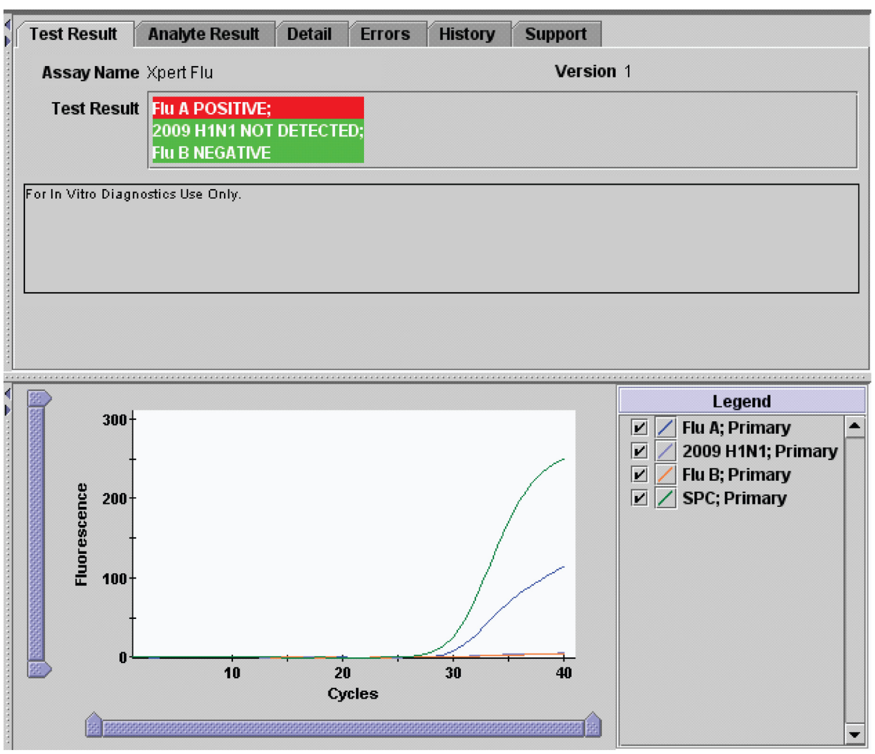


Figure 2. An example of Flu A positive result

Flu A POSITIVE; 2009 H1N1 DETECTED; Flu B NEGATIVE (Figure 3)

Flu A target RNA detected; 2009 H1N1 target RNA detected; Flu B target RNA not detected.

- The Flu A target has a Ct within the valid range and endpoint above the minimum setting.
- The 2009 H1N1 target has a Ct within the valid range and endpoint above the minimum setting.
- SPC – NA (not applicable); SPC is ignored because the Flu A and 2009 H1N1 target amplification may compete with this control.
- Probe Check – PASS; all probe check results pass.

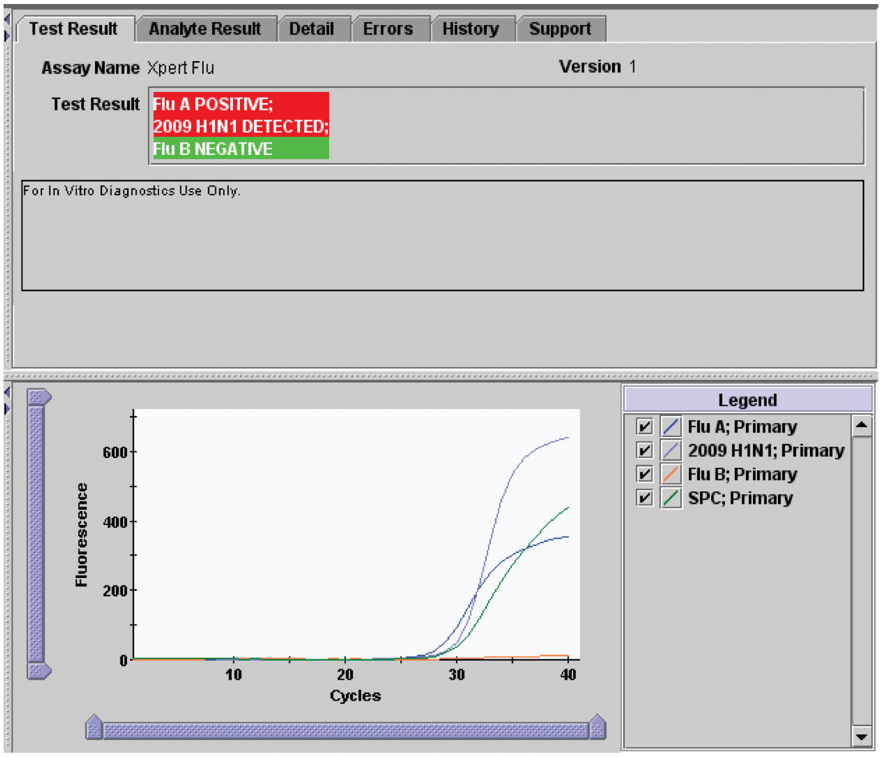


Figure 3. An example of 2009 H1N1 positive result

Flu A NEGATIVE; 2009 H1N1 NOT DETECTED; Flu B POSITIVE (Figure 4)

Flu B target RNA detected; Flu A target RNA not detected; 2009 H1N1 target RNA not detected.

- The Flu B target has a Ct within the valid range and endpoint above the minimum setting.
- SPC – NA (not applicable); SPC is ignored because the Flu B target amplification may compete with this control.
- Probe Check – PASS; all probe check results pass.

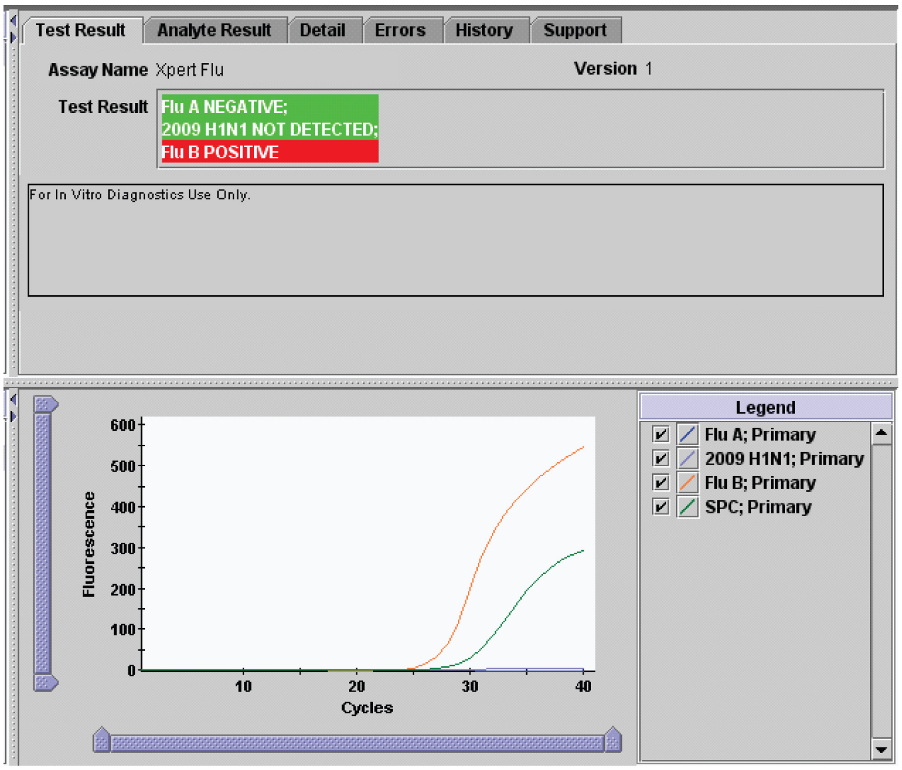


Figure 4. An example of Flu B positive result

Flu A NEGATIVE; 2009 H1N1 NOT DETECTED; Flu B NEGATIVE (Figure 5)

Flu A target RNA not detected; 2009 H1N1 target RNA not detected and Flu B target not detected. SPC meets acceptance criteria.

- Flu A, 2009 H1N1 and Flu B target RNAs are not detected.
- SPC – PASS; SPC has a Ct within the valid range and endpoint above the minimum setting.
- Probe Check – PASS; all probe check results pass.

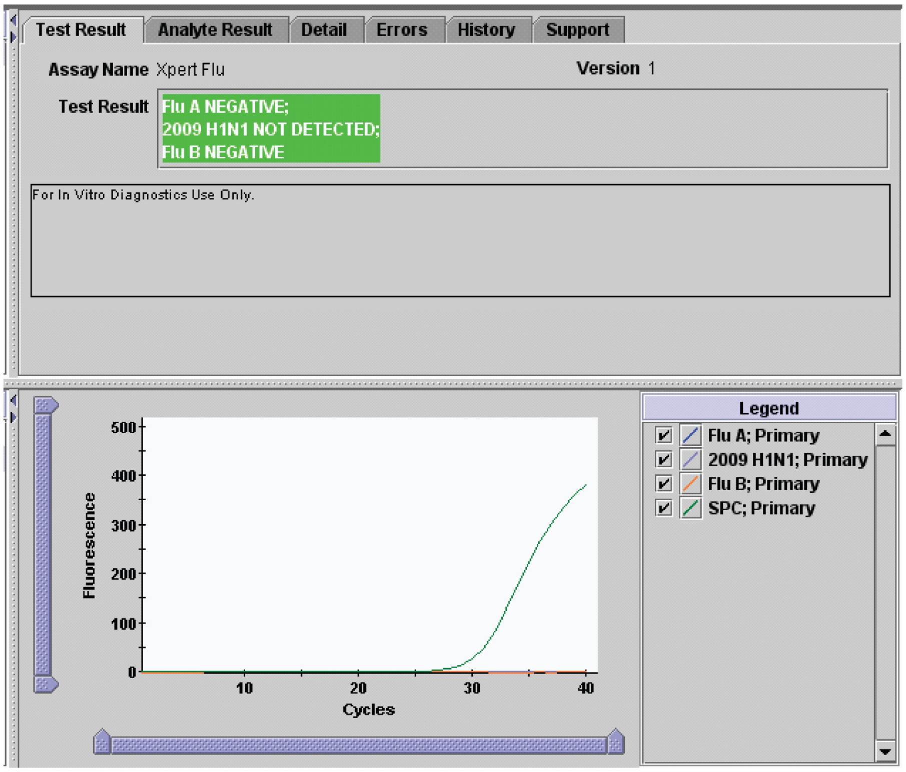


Figure 5. An example of a negative result

INVALID (Figures 6 and 7)

1. SPC does not meet acceptance criteria. Presence or absence of the target RNAs cannot be determined. Repeat test according to the instructions in the Retest Procedure section below.
   - SPC – FAIL; SPC result is negative and the SPC Ct is not within valid range and the endpoint is below the minimum setting.
   - Probe Check – PASS; all probe check results pass.

or

2. Presence or absence of 2009 H1N1 target RNA cannot be determined. Repeat test according to the instructions in the Retest Procedure section below.
   - Flu A target RNA not detected and 2009 H1N1 target RNA detected.
   - SPC – NA (not applicable); SPC is ignored because a target amplified.
   - Probe Check – PASS; all probe check results pass.

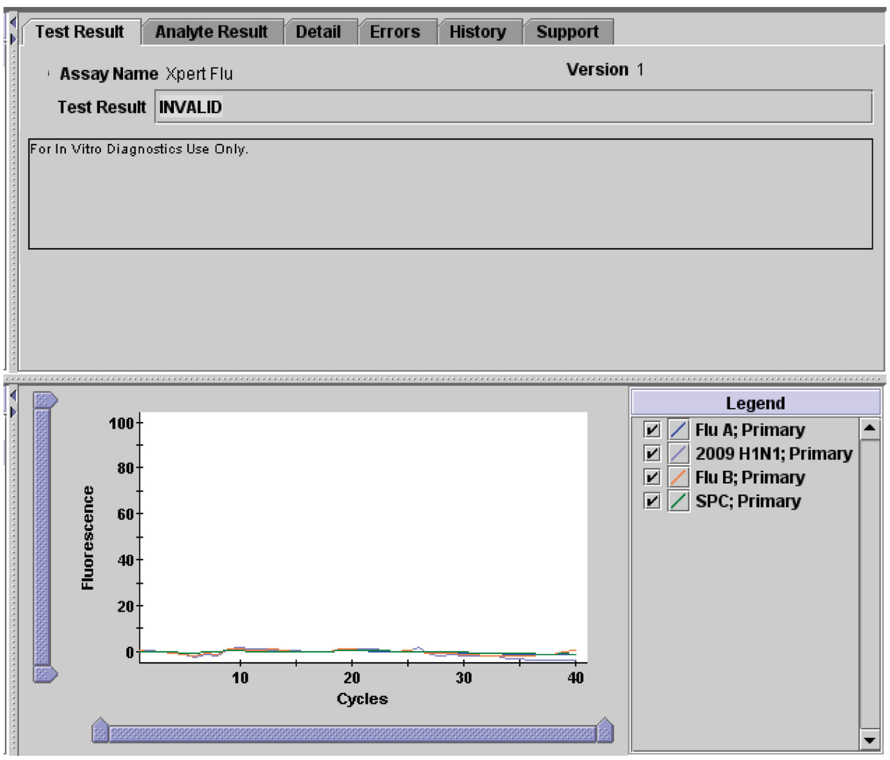


Figure 6. An example of an invalid result (SPC does not meet acceptance criteria)

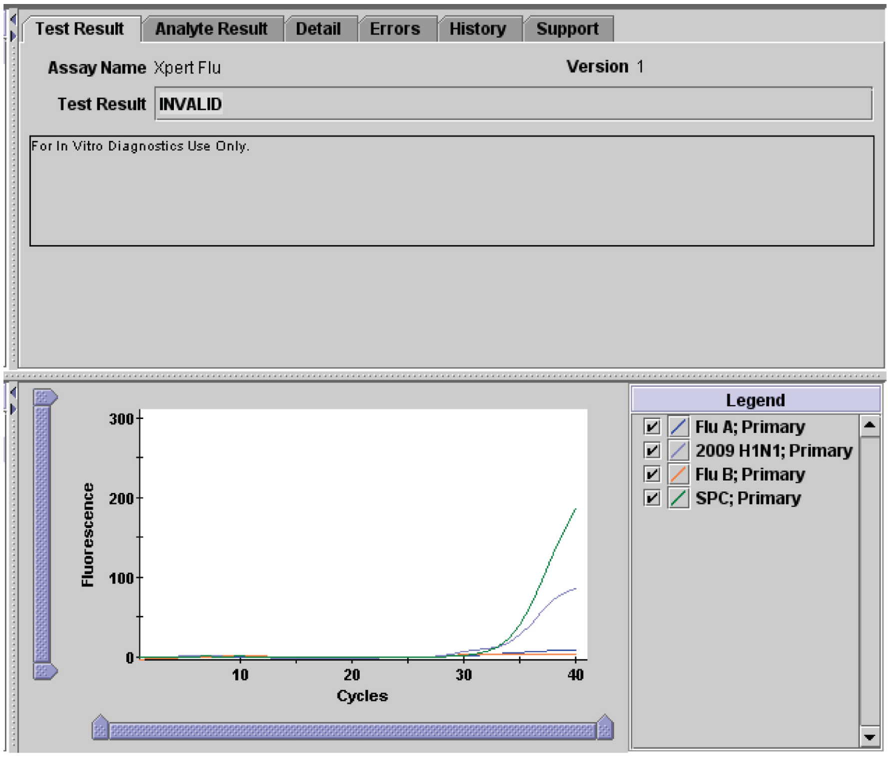


Figure 7. An example of an invalid result (Flu A negative and 2009 H1N1 positive)

ERROR

Presence or absence of Flu A, 2009 H1N1, and Flu B target RNAs cannot be determined. Repeat test according to the instructions in the Retest Procedure section below.

- 2009 H1N1 – NO RESULT
- Flu A – NO RESULT
- Flu B – NO RESULT
- SPC – NO RESULT
- Probe Check – FAIL*; all or one of the probe check results fail

* If the probe check passed, the error is caused by the maximum pressure limit exceeding or by a system component failure.

NO RESULT

Presence or absence of Flu A, 2009 H1N1, and Flu B target RNAs cannot be determined. Repeat test according to the instructions in the Retest Procedure section below. A NO RESULT indicates that insufficient data were collected. For example, the operator stopped a test that was in progress.

- 2009 H1N1 – NO RESULT
- Flu A – NO RESULT
- Flu B – NO RESULT
- SPC – NO RESULT
- Probe Check – NA (not applicable)

Reasons to Repeat the Assay

If any of the test results mentioned below occur, repeat the test according to instructions in the Retest Procedure section below.

- An INVALID result indicates one or more of the following:
  - The control SPC failed;
  - Flu A target RNA is not detected and 2009 H1N1 target RNA is detected;
  - The sample was not properly processed or PCR was inhibited.
- An ERROR result indicates that the assay was aborted. Possible causes include: the reaction tube was filled improperly; a reagent probe integrity problem was detected; or the maximum pressure limit was exceeded.
- A NO RESULT indicates that insufficient data were collected. For example, the operator stopped a test that was in progress, or a power failure occurred.

Retest Procedure

For retest of an indeterminate result, use a new cartridge (do not re-use the cartridge) and new reagents.

For NP swabs use 300 µL of the left over specimen from original UTM tube.

For NA/W use 300 µL of the left over diluted specimen from the 3 mL UTM tube.

1. Remove a new cartridge from the package.
2. Mix the specimen by inverting the tube five times.
3. Open the cartridge lid. Using a clean 300 µL transfer pipette (supplied), transfer 300 µL of the sample to the "S" chamber of the cartridge.
4. Dispense Binding Reagent 1 into cartridge chamber 1. Squeeze the ampoule until the entire contents are added to the cartridge.
5. Close the cartridge lid.

Limitations

- The performance of the Xpert Flu Assay was validated using the procedures provided in this package insert only. Modifications to these procedures may alter the performance of the test.
- Results from the Xpert Flu Assay should be interpreted with other laboratory and clinical data available to the clinician.
- Erroneous test results might occur from improper specimen collection, failure to follow the recommended sample collection, handling and storage procedures, technical error, sample mix-up, or because the number of organisms in the specimen is too low to be detected by the test. Careful compliance with the instructions in this insert is necessary to avoid erroneous results.
- Highly viscous samples, resulting from the addition of 1.5% (w/v) and 2.5 % (w/v) mucin yielded false-negative test results with the Xpert Flu Assay. Inhibition of the Xpert Flu Assay was also observed from the addition of 1% (w/v) mucin resulting in delayed detection of Influenza A, Influenza A subtype 2009 H1N1 and Influenza B.

Performance Characteristics

Clinical Performance

Performance characteristics of the Xpert Flu Assay on archived specimens were evaluated at two institutions in the U.S.

Subjects included individuals whose routine care called for collection of NA/W or NP swab specimens for influenza testing. For eligible subjects, aliquots of leftover sample were obtained for testing with the Xpert Flu Assay and reference testing.

Performance of the Xpert Flu Assay was calculated relative to the reference results (i.e., viral culture followed by direct fluorescence assay (DFA), with sequencing confirmation of all influenza A positive specimens), for specimens in which viral culture was performed prior to freezing. On specimens in which viral culture was not performed prior to freezing, performance of the Xpert Flu Assay was determined relative to the Prodesse ProFlu+™ Assay and sequencing. All Influenza A positive specimens identified by viral culture or ProFlu+ Assay are sequenced to differentiate Influenza A, 2009 H1N1 from other Influenza A subtypes.

Overall Results

A total of 270 archived NP swab specimens were tested for influenza A, influenza A subtype 2009 H1N1 and influenza B by the Xpert Flu Assay and culture. A total of 357 archived NA/W specimens were tested for influenza A, influenza A subtype 2009 H1N1 and influenza B by the Xpert Flu Assay and ProFlu+. All Influenza A positive specimens identified by viral culture or ProFlu+ Assay were sequenced to differentiate Influenza A, 2009 H1N1 from other Influenza A subtypes.

With NP swabs, the Xpert Flu Assay demonstrated a sensitivity and specificity for detection of influenza A of 97.5% and 100%, respectively, relative to viral culture plus DFA, with sequence confirmation of all influenza A positive isolates (Table 1). The Xpert Flu Assay sensitivity and specificity for influenza A subtype 2009 H1N1 with NP swabs were 100% and 100%, respectively (Table 2). The Xpert Flu Assay sensitivity and specificity for influenza B with NP swabs were 93.8% and 99.6%, respectively (Table 3).

Table 1. Xpert Flu Assay Performance vs. Reference Method with NP Swabs—Influenza A

		Viral Culture + DFA		
		Pos	**Neg**	**Total**
Xpert Flu Assay	**Pos**	115	0	115
	Neg	3	152	155
	Total	118	152	270
		Sensitivity:	97.5% (95% CI: 92.8-99.5)	
		Specificity:	100% (95% CI: 97.6-100)	
		Accuracy:	98.9% (95% CI: 96.8-99.8)	
		PPV:	100% (95% CI: 96.8-100)	
		NPV:	98.1% (95% CI: 94.5-99.6)	

Table 2. Xpert Flu Assay Performance vs. Reference Method with NP Swabs—2009 H1N1

		Viral Culture + DFA/Sequencing		
		Pos	**Neg**	**Total**
Xpert Flu Assay	**Pos**	85	0	85
	Neg	0	182	182
	Total	85	182	267
		Sensitivity:	100% (95% CI: 95.6-100)	
		Specificity:	100% (95% CI: 98.0-100)	
		Accuracy:	100% (95% CI: 98.6-100)	
		PPV:	100% (95% CI: 95.6-100)	
		NPV:	100% (95% CI: 98.0-100)	

Table 3. Xpert Flu Assay Performance vs. Reference Method with NP Swabs—Influenza B

		Viral Culture + DFA		
		Pos	**Neg**	**Total**
Xpert Flu Assay	**Pos**	30	1	31
	Neg	2	237	239
	Total	32	238	270
		Sensitivity:	93.8% (95% CI: 79.2-99.2)	
		Specificity:	99.6% (95% CI: 97.7-100)	
		Accuracy:	98.9% (95% CI: 96.8-99.8)	
		PPV:	96.8% (95% CI: 83.3-99.9)	
		NPV:	99.2% (95% CI: 97.0-99.9)	

Relative to the ProFlu+ Assay with sequence confirmation of all influenza A positive isolates, the Xpert Flu Assay identified 99.2% of the NA/W specimens positive for influenza A and 100% of the specimens negative for influenza A (Table 4). The Xpert Flu Assay identified 97.9% of the NA/W specimens positive for influenza A subtype 2009 H1N1 and 100% of the specimens negative for influenza A subtype 2009 H1N1 (Table 5). The Xpert Flu Assay identified 100% of the NA/W specimens positive for influenza B and 100% of the specimens negative for influenza B (Table 6).

Table 4. Xpert Flu A Panel Performance vs. Reference Method with NA/W Specimen—Influenza A

		ProFlu+		
		Pos	**Neg**	**Total**
Xpert Flu Assay	**Pos**	125	0	125
	Neg	1	231	232
	Total	126	231	357
		Sensitivity:	99.2% (95% CI: 95.7-100)	
		Specificity:	100% (95% CI: 98.4-100)	
		Accuracy:	99.7% (95% CI: 98.5-100)	
		PPV:	100% (95% CI: 97.1-100)	
		NPV:	99.6% (95% CI: 97.6-100)	

Table 5. Xpert Flu A Panel Performance vs. Reference Method with NA/W Specimen—2009 H1N1

		ProFlu+/Sequencing		
		Pos	Neg	Total
Xpert Flu Assay	Pos	94	0	94
	Neg	2	261	263
	Total	96	261	357
		Sensitivity:	97.9% (95% CI: 92.7-99.8)	
		Specificity:	100% (95% CI: 98.6-100)	
		Accuracy:	99.4% (95% CI: 98.0-99.9)	
		PPV:	100% (95% CI: 96.1-100)	
		NPV:	99.2% (95% CI: 98.6-100)	

Table 6. Xpert Flu A Panel Performance vs. Reference Method with NA/W Specimen—Influenza B

		ProFlu+		
		Pos	Neg	Total
Xpert Flu Assay	Pos	40	0	40
	Neg	0	317	317
	Total	40	317	357
		Sensitivity:	100% (95% CI: 91.2-100)	
		Specificity:	100% (95% CI: 98.8-100)	
		Accuracy:	100% (95% CI: 99.0-100)	
		PPV:	100% (95% CI: 91.2-100)	
		NPV:	100% (95% CI: 98.8-100)	

Of the Xpert Flu Assays runs performed with eligible NP swab specimens, 98.9% (267/270) of these specimens were successful on the first attempt. The remaining 3 gave indeterminate results on the first attempt (1 INVALID and 2 ERROR). All 3 specimens gave a result on the second attempt. Of the Xpert Flu Assays run with eligible NA/W specimens, 95.5% (342/358) were successful on the first attempt. The remaining 16 gave indeterminate results on the first attempt (4 INVALID, 11 ERROR, and 1 NO RESULT). Fifteen of the 16 specimens gave a result on the second attempt.

Analytical Performance

Analytical Sensitivity (Limit of Detection)

Studies were performed to determine the 95% confidence intervals for the analytical limit of detection (LoD) of 2 seasonal Influenza A (H1N1), 2 seasonal Influenza A (H3N2), 5 Influenza A 2009 H1N1 and 2 Influenza B strains diluted into a surrogate nasopharyngeal matrix. The surrogate matrix consisted of 1% human blood, 2.5% mucin and 0.85% sodium chloride. The limit of detection is defined as the lowest concentration (tissue culture infective dose $TCID_{50}$/mL) per sample that can be reproducibly distinguished from negative samples with 95% confidence or the lowest concentration at which 19 of 20 replicates were positive. Each strain was tested in replicates of 20 per concentration of virus.

The estimate and confidence intervals were determined using logistic regression with data (number of positive results per number of replicates at each level) over the range of concentrations tested. The confidence intervals were determined using maximum likelihood estimates on the logistic model parameters using variance-covariance matrix. The LoD point estimates and 95% upper and lower confidence intervals for each strain tested are summarized in tables 7 through 10.

Table 7. 95% Confidence Intervals for Analytical LoD—Seasonal Influenza A H1N1

Strain ID-Influenza A H1N1	Lower 95% CI	LoD ($TCID_{50}$/mL)	Upper 95% CI
Influenza A/H1/Brisbane/59/07	1.0	1.3	1.9
Influenza A/H1/New Calendonia/20/1999	5.9	7.3	11.7

Table 8. 95% Confidence Intervals for Analytical LoD—Seasonal Influenza A H3N2

Strain ID-Influenza A H3N2	Lower 95% CI	LoD ($TCID_{50}$/mL)	Upper 95% CI
Influenza A/H3/Brisbane/10/07	2.1	2.5	3.3
Influenza A/H3/Wisconsin/67/05	5.0	5.9	7.9

Table 9. 95% Confidence Intervals for Analytical LoD—Influenza A 2009 H1N1

Strain ID-2009 H1N1	Lower 95% CI	LoD ($TCID_{50}$/mL)	Upper 95% CI
Influenza A/SwineNY/01/2009	1.1	1.4	2.1
Influenza A/SwineNY/02/2009	4.0	4.8	7.3
Influenza A/SwineNY/03/2009	3.3	3.5	4.1
Influenza A/Canada/6294	66.3	77.1	105.4
Influenza A/WI/629-S1/2009	15.0	16.2	19.1

Table 10. 95% Confidence Intervals for Analytical LoD—Influenza B

Strain ID-Influenza A H1N1	Lower 95% CI	LoD ($TCID_{50}$/mL)	Upper 95% CI
Influenza B/Florida/02/06	1.2	1.5	2.2
Influenza B/Florida/07/04	41.3	50.6	72.9

Analytical Specificity (Cross-Reactivity)

The analytical specificity of the Xpert Flu Assay was evaluated by testing a panel of 40 cultures consisting of 18 viral, 21 bacterial, and 1 yeast strain representing common respiratory pathogens or those potentially encountered in the nasopharynx. Three replicates of all bacterial and yeast strains were tested at concentrations $\geq 10^6$ CFU/mL. Three replicates of all viruses were tested at concentrations $\geq 10^4$ $TCID_{50}$/mL. Positive and Negative controls were included in the study. The analytical specificity was 100%. Results are shown in Table 11.

Table 11. Analytical Specificity of Xpert Flu Assay

Strain	Concentration (per Cartridge)	Influenza A	Influenza A 2009 H1N1	Influenza B
Positive Control 1 – Influenza A/Influenza B	N/A	+	-	+
Positive Control 2 – Influenza A 2009 H1N1	N/A	+	+	-
Negative Control	N/A	-	-	-
Adenovirus Type 7A	1×10^6 $TCID_{50}$/mL	-	-	-
Adenovirus Type 1	1×10^6 $TCID_{50}$/mL	-	-	-
Human Coronavirus 229E	1×10^6 $TCID_{50}$/mL	-	-	-
Human Coronavirus OC43	1×10^4 $TCID_{50}$/mL	-	-	-
Cytomegalovirus*	1×10^5 Copies/mL	-	-	-
Enterovirus Type 71	1×10^6 $TCID_{50}$/mL	-	-	-
Epstein-Barr Virus	1×10^5 $TCID_{50}$/mL	-	-	-
Parainfluenzavirus Type 1	1×10^5 $TCID_{50}$/mL	-	-	-
Parainfluenzavirus Type 2	1×10^6 $TCID_{50}$/mL	-	-	-
Parainfluenzavirus Type 3	1×10^6 $TCID_{50}$/mL	-	-	-
Measles Virus	1×10^6 $TCID_{50}$/mL	-	-	-
Human Metapneumovirus	1×10^6 $TCID_{50}$/mL	-	-	-
Mumps Virus	1×10^6 $TCID_{50}$/mL	-	-	-
Respiratory Syncytial Virus A	1×10^6 $TCID_{50}$/mL	-	-	-
Respiratory Syncytial Virus B	1×10^6 $TCID_{50}$/mL	-	-	-
Human HSV Type 1	1×10^6 $TCID_{50}$/mL	-	-	-
Human Rhinovirus Type 4	1×10^6 $TCID_{50}$/mL	-	-	-
Echovirus 11	1×10^6 $TCID_{50}$/mL	-	-	-
*Bordetella pertussis**	1×10^6 Copies/mL	-	-	-
Chlamydia pneumoniae	1×10^6 CFU/mL	-	-	-
Corynebacterium xerosis	1×10^6 CFU/mL	-	-	-
Escherichia coli	1×10^6 CFU/mL	-	-	-
Proteus vulgaris	1×10^6 CFU/mL	-	-	-
Proteus mirabilis	1×10^6 CFU/mL	-	-	-
Klebsiella pneumoniae	1×10^6 CFU/mL	-	-	-
Haemophilus influenzae	1×10^6 Copies/mL	-	-	-
Lactobacillus crispatus	1×10^6 CFU/mL	-	-	-
Legionella pneumophila	1×10^6 CFU/mL	-	-	-
Moraxella catarrhalis	1×10^6 CFU/mL	-	-	-
Mycobacterium tuberculosis (BCG strain)	1×10^6 CFU/mL	-	-	-
Mycoplasma pneumoniae	1×10^6 CFU/mL	-	-	-
Neisseria meningitides	1×10^6 CFU/mL	-	-	-
Neisseria Cinneria	1×10^6 CFU/mL	-	-	-
Pseudomonas aeruginosa	1×10^6 CFU/mL	-	-	-
Staphylococcus aureus	1×10^6 CFU/mL	-	-	-
Staphylococcus epidermidis	1×10^6 CFU/mL	-	-	-
Streptococcus pneumoniae	1×10^6 CFU/mL	-	-	-
Streptococcus pyogenes	1×10^6 CFU/mL	-	-	-
Streptococcus salivarius	1×10^6 CFU/mL	-	-	-

Table 11. Analytical Specificity of Xpert Flu Assay (Continued)

Strain	Concentration (per Cartridge)	Influenza A	Influenza A 2009 H1N1	Influenza B
Candida albicans	1×10^6 CFU/mL	-	-	-

*Nucleic acid was tested for Cytomegalovirus and Bordetella pertussis.

Analytical Reactivity (Inclusivity)

The analytical reactivity of the Xpert Flu Assay was evaluated against multiple strains of Influenza A (H1N1, H3N2, H5N2, H5N1 and H7N3 subtypes), Influenza A 2009 H1N1 and Influenza B. Of these, Influenza A subtype H1N1 (12), Influenza A subtype H3N2 (7), Influenza A subtype 2009 H1N1 (6), Influenza A subtype H5N1 (1), Influenza A subtype H5N2 (1), Influenza A subtype H7N3 (1) and Influenza B (11) were included. Three replicates of each viral strain were tested at 5 – 500 $TCID_{50}$/mL. Results are shown in Table 12.

Table 12. Analytical Reactivity (Inclusivity) of Xpert Flu Assay

Viral Strain	Concentration ($TCID_{50}$/mL)	Influenza A	Influenza A 2009 H1N1	Influenza B
Influenza A/Denver/1/57 (H1N1)	500	+	-	-
Influenza A/NewYork/55/2004 (H1N1)	500	+	-	-
Influenza A/Mal/302/54 (H1N1)	50	+	-	-
Influenza A/New Jersey/8/76 (H1N1)	500	+	-	-
Influenza A/NWS/33 (H1N1)	5	+	-	-
Influenza A/PR/8/34 (H1N1)	500	+	-	-
Influenza A/Taiwan/42/06 (H1N1)	500	+	-	-
Influenza A/WS/33 (H1N1)	5	+	-	-
Influenza A/Swine/1976/31 (Swine H1N1)	500*	+	-	-
Influenza A/Swine/Iowa/15/30 (Swine H1N1)	500*	+	-	-
Influenza A/Brisbane/59/07 (H1N1)	5	+	-	-
Influenza A/NewCalendonia/20/1999 (H1N1)	50	+	-	-
Influenza A/Victoria/3/75 (H3N2)	500	+	-	-
Influenza A/Aichi2/68 (H3N2)	500	+	-	-
Influenza A/Hong Kong/8/68 (H3N2)	50	+	-	-
Influenza A/Hawaii/15/2001 (H3N2)	500	+	-	-
Influenza A/Port Chalmers/1/73 (H3N2)	500	+	-	-
Influenza A/Brisbane/10/07 (H3N2)	10	+	-	-
Influenza A/Wisconsin/67/05 (H3N2)	10	+	-	-
Influenza A/SwineNY/01/2009 (09 H1N1)	10	+	+	-
Influenza A/SwineNY/02/2009 (09 H1N1)	100	+	+	-
Influenza A/SwineNY/03/2009 (09 H1N1)	10	+	+	-
Influenza A/California/4/2009 (09 H1N1)	5	+	+	-
Influenza A/Canada/6294 (09 H1N1)	500	+	+	-
Influenza A/WI/929-S1 (09 H1N1)	100	+	+	-
Influenza A/Mallard/WI/34/75 (H5N2)	3 pg/µL^^	+	-	-
Influenza A/Anhui/02/2005/PR8-IBCDC-RG5 (H5N1)	0.122 pg/µL^^	+	-	-

Table 12. Analytical Reactivity (Inclusivity) of Xpert Flu Assay (Continued)

Viral Strain	Concentration ($TCID_{50}$/mL)	Influenza A	Influenza A 2009 H1N1	Influenza B
Influenza A/chicken/NJ/15086-3/94 (H7N3)	5 pg/µL^^	+	-	-
Influenza B/Allen/45	500	-	-	+
Influenza B/Florida/02/06	10	-	-	+
Influenza B/Florida/04/06	500	-	-	+
Influenza B/Florida/07/04	50	-	-	+
Influenza B/GL/1739/54	500	-	-	+
Influenza B/Hong Kong/5/72	500	-	-	+
Influenza B/Lee/40	500	-	-	+
Influenza B/Malaysia/2506/04	500	-	-	+
Influenza B/Maryland/1/59	500	-	-	+
Influenza B/Panama/45/90	500	-	-	+
Influenza B/Taiwan/2/62	50^	-	-	+

* Concentration expressed as PFU/mL; ^concentration expressed as CEID50/mL; ^^concentration expressed in picograms/µL.

Interfering Substances Study

In a non-clinical study, potentially interfering substances that may be present in the nasopharynx were evaluated directly relative to the performance of the Xpert Flu Assay. Potentially interfering exogenous substances in the nasopharynx may include, but are not limited to: blood, nasal secretions or mucus, and nasal and throat medications used to relieve congestion, nasal dryness, irritation, or asthma and allergy symptoms. These substances are listed in Table 13 with active ingredients and concentrations tested shown. Highly viscous samples, resulting from the addition of 1.5% (w/v) and 2.5 % (w/v) mucin yielded false-negative test results with the Xpert Flu Assay. Inhibition of the Xpert Flu Assay was also observed from the addition of 1% (w/v) mucin resulting in delayed detection of Influenza A, Influenza A subtype 2009 H1N1 and Influenza B.

Table 13. Potentially Interfering Substances in Xpert Flu Assay

Substance	Description/Active Ingredient	Concentration Tested
Blood (human)	N/A	2% (v/v)
Mucin	Purified mucin protein (Bovine or porcine submaxillary gland)	2.5%, 1.5%, 1%, and 0.5% (w/v)
Neo-Synephrine®Nasal Drops	Phenylephrine HCl	15% (v/v)
Anefrin Nasal Spray	Oxymetazoline Hydrochloride	15% (v/v)
Zicam® Nasal Gel	Luffa opperculata, Galphimia glauca, Histaminum hydrochloricum Sulfur	5% (v/v)
Saline Nasal Spray	Sodium Chloride with preservatives	15% (v/v)
Antibiotic, nasal ointment	Mupirocin	10 mg/mL
Antibacterial, systemic	Tobramycin	4.0 µg/mL
Throat lozenges, oral anesthetic and analgesic	Menthol	1.7 mg/mL menthol

Carry-Over Contamination Study

A study was conducted to demonstrate that single-use, self-contained GeneXpert cartridges prevent carry-over contamination in negative samples run following very high positive samples in the same GeneXpert module. The study consisted of a negative sample processed in the same GeneXpert module immediately following a very high Influenza A subtype 2009 H1N1 sample (roughly 10^6 $TCID_{50}$/test) or Influenza B sample (roughly 10^6 $TCID_{50}$/test). This testing scheme was repeated 20 times on 4 GeneXpert modules for a total of 88 runs resulting in 40 positive and 48 negative specimens. All 40 positive samples were correctly reported as Influenza A 2009 H1N1 positive or Influenza B positive. All 48 negative samples were correctly reported as Flu A negative, 2009 H1N1 not detected and Flu B negative.

Reproducibility

A panel of 10 specimens with varying concentrations of influenza A, influenza B, and influenza A subtype 2009 H1N1 were tested in duplicate on 10 different days at each of three sites (10 specimens × 2 times/ day × 10 days × 3 sites). One lot of Xpert Flu Assay was used at each of the three testing sites. Xpert Flu Assays were performed according to the Xpert Flu Assay procedure. Results are summarized in Table 14.

Table 14. Summary of Reproducibility Results[a]

Sample ID	Site 1	Site 2	Site 4	% Total Agreement by Sample
Negative	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (60/60)
Flu A moderate positive	100% (20/20)	100% (19/19)[b]	100% (20/20)	100% (59/59)
Flu A low positive	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (60/60)
Flu A high negative	100% (20/20)	95.0% (19/20)	90% (18/20)	95.0% (57/60)
2009 H1N1 moderate positive	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (60/60)
2009 H1N1 low positive	100% (20/20)	100% (19/19)[a]	100% (20/20)	100% (59/59)
2009 H1N1 high negative	94.7% (18/19)[b]	100% (20/20)	89.5% (17/19)[b]	94.8% (55/58)[c]
Flu B moderate positive	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (60/60)
Flu B low positive	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (60/60)
Flu B high negative	90.0% (18/20)	95.0% (19/20)	55.0% (11/20)	80.0% (48/60)
% Total Agreement	98.5% (196/199)	99.0% (196/198)	93.5% (186/199)	97.0% (578/596)

[a]n=19 because one sample was indeterminate and not retested.
[b]n=19 because repeat yielded indeterminate result.
[c]9/55 samples negative for 2009 H1N1 resulted in a valid Flu A positive call, as the Flu A signal was detected. A valid 2009 H1N1 positive call requires detection of both the Flu A and 2009 H1N1 signals.

References

1. Petric M, Comanor L, Petti CA. Role of the laboratory in diagnosis of influenza during seasonal epidemics and potential pandemics. J Infect Dis. 2006;194:S98-110.

2. Schweiger B, Zadow I, Heckler R, et al. Application of a fluorogenic PCR assay for typing and subtyping of influenza viruses in respiratory samples. J Clin Micro. 2000;38:1552-1558.

3. http://www.cdc.gov Accessed on February 22, 2010.

4. Centers for Disease Control and Prevention. Biosafety in Microbiological and Biomedical laboratories. Richmond JY and McKinney RW (eds) (1993). HHS Publication number (CDC) 93-8395.

5. Interim Biosafety Guidance for All Individuals Handling Clinical Specimens or Isolates Containing 2009-H1N1 Influenza A Virus (Novel H1N1), including Vaccine Strains, August 15, 2009; (http://www.cdc.gov/h1n1flu/guidelines_labworkers.htm).

6. Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly National Committee for Clinical Laboratory Standards). Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline. Document M29 (refer to latest edition).

Assistance

For assistance, contact Cepheid using one of the following contact details. Make sure you provide the instrument serial number and reagent lot ID when you call or email.

North America

For technical support, use the following contact details:

Tel: +1.888.838.3222

Email: techsupport@cepheid.com

You can reach Cepheid Technical Support by telephone Monday through Friday, from 5 A.M. to 5 P.M. Pacific Time.

European Union

For technical support, use the following contact details:

Tel: +33.563.82.53.19

Fax: +33.563.82.53.01

Email: techsupport@cepheideurope.fr

Other Locations

Contact your local Cepheid representative.

Table of Symbols

Table 15. Symbol Meaning

Symbol	Meaning
REF	Catalog number
IVD	*In vitro* diagnostic medical device
	Do not re-use
	Manufacturer
Σ	Contains sufficient for <n> tests
CONTROL	Control
EC REP	Authorized representative in the European Community
	Temperature limitation
	Biological hazard

Manufacturer

Cepheid
904 Caribbean Drive
Sunnyvale, CA 94089-1189

Phone: +1.408.541.4191
Fax: +1.408.541.4192

EC REP Authorized Representative

Cepheid Europe
Vira-Solelh
81470 Maurens-Scopont
France

Tel: +33.563.82.53.00
Fax: +33.563.82.53.01
Email: cepheid@cepheideurope.fr

CE IVD

Français

Pour une utilisation de diagnostic *in vitro* uniquement

Nom déposé

Xpert® Flu

Nom d'usage

Xpert Flu Assay

Utilisation prévue

Xpert Flu Assay de Cepheid® est un test RT-PCR (réaction en chaîne par polymérase) automatisé, multiplex et en temps réel, destiné à la détection et à la différentiation qualitatives *in vitro* des ARN viraux de la grippe, Influenza A, Influenza B et H1N1 de 2009. Le test Xpert Flu Assay utilise des utilise des aspirations/lavages nasaux et des échantillons rhinopharyngés prélevés par écouvillonnage sur des patients présentant des signes et symptômes d'infection respiratoire, en conjonction avec des facteurs de risque cliniques et épidémiologiques. Le test Xpert Flu Assay a pour but d'aider à établir le diagnostic de la grippe.

Résumé et explication

La grippe, ou influenza, est une infection virale contagieuse des voies respiratoires, qui se produit souvent pendant l'hiver. La transmission de la grippe est essentiellement aérogène (c.-à-d. par la toux ou les éternuements). Les symptômes courants incluent fièvre, frissons, maux de tête, malaises, toux et congestion des sinus. Des symptômes gastro-intestinaux (nausées, vomissements ou diarrhée) peuvent également survenir, notamment chez les enfants, mais de façon moins fréquente. Les symptômes apparaissent généralement dans les deux jours qui suivent l'exposition à un individu infecté. Les complications possibles d'une infection par la grippe incluent la pneumonie, cause de morbidité et de mortalité accrues chez les enfants, les personnes âgées et les populations immunovulnérables.[1,2]

Les virus de la grippe sont classés en types A, B et C, les deux premiers étant à l'origine de la plupart des infections humaines. La grippe A, la plus commune chez l'homme, est généralement responsable des épidémies de grippe saisonnières et peut potentiellement entraîner des pandémies. Les virus de la grippe A peuvent également infecter des animaux tels que les oiseaux, les porcs et les chevaux. Les infections par le virus de la grippe B sont généralement limitées à l'homme et n'entraînent que plus rarement des épidémies. Les virus de la grippe A se divisent en sous-types, en fonction de deux protéines de surface : l'hémagglutinine (H) et la neuraminidase (N). La grippe saisonnière est généralement causée par la combinaison des sous-types H1, H2, H3, N1 et N2. Outre les virus de la grippe saisonnière déjà en circulation, une nouvelle souche H1N1 a été identifiée chez l'homme début 2009.[3]

Des programmes de surveillance active, ainsi que des précautions pour le contrôle des infections, sont des éléments importants de prévention de la transmission de la grippe. L'utilisation de tests fournissant des résultats rapides pour identifier et différencier l'agent infectieux chez les patients atteints de la grippe saisonnière et du virus H1N1 de 2009 est également un facteur important pour un contrôle efficace, un choix de traitement approprié et la prévention d'épidémies de grippe massives.

Principe de la procédure

Le test Xpert Flu Assay est un test de diagnostic *in vitro* rapide et automatisé, permettant la détection qualitative de la grippe A, de la grippe B et du sous-type H1N1 de 2009 de la grippe A. Le test est réalisé avec le GeneXpert® Dx System de Cepheid.

Le GeneXpert Dx System automatise et intègre la purification d'échantillons, l'amplification d'acide nucléique et la détection de la séquence cible dans des échantillons simples ou complexes, en utilisant des tests de PCR et de RT-PCR en temps réel. Le système est composé d'un appareil, d'un ordinateur personnel et d'un logiciel préchargé pour effectuer des tests et afficher les résultats. Il requiert l'utilisation de cartouches jetables à usage unique GeneXpert, qui contiennent les réactifs PCR et RT-PCR et abritent les procédures de PCR et RT-PCR. La contamination croisée entre les échantillons est minimisée car les cartouches sont indépendantes. Pour obtenir une description complète du système, consulter le *Manuel d'utilisation du GeneXpert Dx System* correspondant.

Le test Xpert Flu Assay inclut des réactifs pour la détection et la différentiation de la grippe A, de la grippe B et du sous-type de grippe A H1N1 de 2009, directement à partir d'aspirations/lavages nasaux et des échantillons rhinoparyngés prélevés par écouvillonnage sur des patients suspectés d'être atteints de la grippe. Un contrôle du traitement de l'échantillon (CTE) et un contrôle de la sonde sont également inclus dans la cartouche. Le CTE contrôle le traitement approprié des virus cibles, ainsi que la présence d'inhibiteurs lors de la réaction PCR. Le contrôle de la sonde consiste à vérifier la réhydratation des réactifs, le remplissage des tubes de PCR dans la cartouche, l'intégrité de la sonde et la stabilité du fluorochrome.

Réactifs et appareils

Matériel fourni

Le kit du test Xpert Flu Assay contient suffisamment de réactifs pour traiter 10 échantillons ou échantillons de contrôle. Le kit contient les éléments suivants :

- **Cartouches de test Xpert Flu Assay avec tubes de réaction intégrés** — **10**
- **Billes de réactifs (lyophilisés) 1** — **1 par cartouche**
  - Enzyme transcriptase inverse
  - Enzyme Polymérase Taq
  - dNTPs
  - Sonde
  - SAB (sérum-albumine bovin)
  - Sels
- **Billes de réactifs (lyophilisés) 2** — **1 par cartouche**
  - Amorces
  - Sondes
  - dNTPs
  - SAB (sérum-albumine bovin)
  - Sels
- **Billes de réactifs (lyophilisés) 3** — **1 par cartouche**
  - Contrôle du traitement de l'échantillon (CTE), témoin de préparation d'échantillons non infectieux Armored RNA®
- **Réactif de lyse** — **2,0 ml par cartouche**
  - Chlorydrate de guanidine, surfactants
- **Réactif de lavage** — **0,5 ml par cartouche**
  - PEG, Monothioglycérol, KCl, tampon Tris, EDTA, surfactants, azoture de sodium
- **Réactif d'élution** — **2,0 ml par cartouche**
  - Tampon Tris-EDTA, Tween 20
- **Pochette de réactifs Xpert Flu Assay** — **1 par kit**
- **Réactif de fixation** — **10 x 1,0 ml par ampoule**
  - eau, éthanol
- **Pipettes de transfert jetables 300 µl** — **2 pochettes de 12 par kit**
- **CD** — **1 par kit**
  - Fichier de définition de tests (ADF, Assay Definition File)
  - Instructions d'importation de l'ADF dans le logiciel GX
  - Notice

Remarques:

- Les fiches techniques de de substances dangereuses (Material Safety Data Sheets, MSDS) de tous les réactifs fournis dans ce test sont disponibles auprès de l'assistance technique de Cepheid ou sur http://www.cepheid.com/tests-and-regeants/literature/msds/.
- Le sérum-albumine bovin (SAB) de ce produit a été extrait exclusivement à partir de plasma bovin provenant des États-Unis. La fabrication du SAB est également réalisée aux États-Unis. Les aliments donnés aux animaux ne contenaient pas de protéines de ruminants ou d'autres protéines animales; les animaux ont subi des tests ante et post mortem. Au cours du processus, aucun mélange ne s'est produit avec d'autres matières animales.

Stockage et manipulation

- Conservez les cartouches et les réactifs du test Xpert Flu Assay à une température comprise entre 2 et 28 °C.
- N'ouvrez pas de cartouche tant que vous n'êtes pas prêt à effectuer un test.
- N'utilisez aucun réactif devenu trouble ou décoloré.
- N'utilisez pas de cartouche présentant des traces de fuite.

Matériel requis mais non fourni

- GeneXpert Dx System (la référence varie en fonction de la configuration) : Appareil GeneXpert, ordinateur équipé d'un logiciel propriétaire, lecteur de code-barres et manuel d'utilisation
- Imprimante (consultez le *Manuel d'utilisation du GeneXpert Dx System* pour obtenir des informations sur la compatibilité)

Matériel disponible mais non fourni

- Kit de collecte d'échantillons nasaux, référence Cepheid NASL-100N-100.
- Contrôles de virus inactivés ZeptoMetrix, références NATFLUA/B-6MC et NATFLUAH1N1-MC pour les contrôles positifs externes et NATCXVA9-MC (virus Coxsackie) pour contrôle négatif externe.

Avertissements et précautions

- Traitez tous les échantillons biologiques, notamment les cartouches usagées, comme s'ils étaient susceptibles de transmettre des agents infectieux. Tous les échantillons biologiques doivent être traités avec des précautions identiques, car il est souvent impossible de savoir quel échantillon peut être infectieux. Les U.S. Centers for Disease Control and Prevention (centres américains pour le contrôle et la prévention des maladies)[4,5] et le Clinical and Laboratory Standards Institute (Institut des normes cliniques et de laboratoire, anciennement National Committee for Clinical Laboratory Standards) ont à disposition des directives concernant la manipulation des échantillons.[6]
- Respectez les procédures de sécurité de votre institution pour la manipulation de produits chimiques et d'échantillons biologiques.
- Ne remplacez pas les réactifs Xpert Flu Assay par d'autres réactifs.
- N'ouvrez pas le couvercle de la cartouche du test Xpert Flu Assay, sauf pour ajouter un échantillon et des réactifs.
- N'utilisez pas une cartouche tombée ou secouée après avoir ajouté l'échantillon et les réactifs.
- N'utilisez pas une cartouche dont le tube réactionnel est endommagé.
- Chaque cartouche Xpert Flu Assay à usage unique est utilisée pour effectuer un test. Ne réutilisez pas les cartouches usagées.
- Consultez les responsables de l'élimination des déchets de votre institution pour savoir comment éliminer les cartouches usagées et réactifs non utilisés. Ce matériel peut présenter des caractéristiques visées par la législation fédérale sur la conservation et la récupération des ressources (Resource Conservation and Recovery Act, RCRA) de l'agence américaine de protection de l'environnement concernant les déchets dangereux dont la collecte et l'élimination nécessitent des prescriptions particulières. Vérifiez les réglementations nationales et locales qui peuvent différer des dispositions fédérales. Les institutions hors des États-Unis doivent prendre connaissance des dispositions sur l'élimination des déchets dangereux en vigueur dans leur pays.
- Conservez le kit du test Xpert Flu Assay à une température comprise entre 2 et 28 °C.
- N'ouvrez pas l'emballage d'une cartouche tant que vous n'êtes pas prêt à effectuer un test.

Collecte, transport et stockage d'échantillons

Les échantillons A/LN ou RP peuvent être recueillis conformément aux pratiques standard de l'institution de l'utilisateur et placés dans un milieu de transport universel (tubes UTM de 3 ml).

Les échantillons doivent être transportés entre 2 et 8 °C. Ils peuvent être stockés jusqu'à 72 heures entre 2 et 8 °C avant traitement.

Procédure

Préparation de la cartouche

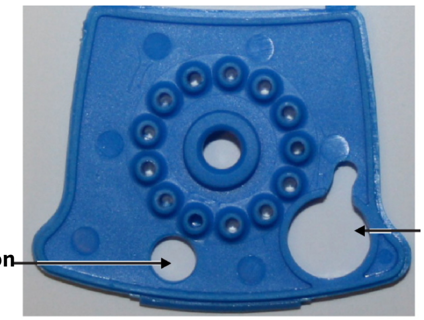
Important : Démarrez le test dans les 60 minutes qui suivent l'ajout de l'échantillon et du réactif dans la cartouche.

Pour les échantillons RP

1. Enlevez la cartouche et les réactifs de l'emballage.
2. Mélangez l'échantillon en retournant cinq fois le tube UTM.
3. Ouvrez le couvercle de la cartouche. Utilisez une pipette de transfert propre (fournie) et transférez 300 µl du tube UTM dans la chambre marquée « S » de la cartouche.
4. Versez le réactif de fixation 1 dans la chambre 1 de la cartouche. Pressez l'ampoule jusqu'à ce que tout le contenu soit ajouté à la cartouche.
5. Fermez le couvercle de la cartouche.

Pour les échantillons A/LN

1. Utilisez une pipette de transfert propre de 300 µl (fournie) et transférez 600 µl d'échantillon (en pipetant deux fois 300 µl) dans le tube UTM de 3 ml, puis rebouchez le tube.
2. Mélangez l'échantillon en retournant cinq fois le tube.
3. Enlevez la cartouche et les réactifs de l'emballage.
4. Ouvrez le couvercle de la cartouche. Utilisez une pipette de transfert propre de 300 µl (fournie) et transférez 300 µl de l'échantillon dilué dans la chambre marquée « S » de la cartouche.
5. Versez le réactif de fixation 1 dans la chambre 1 de la cartouche. Pressez l'ampoule jusqu'à ce que tout le contenu soit ajouté à la cartouche.
6. Fermez le couvercle de la cartouche.



Chambre 1 = Réactif de fixation 1, chambre « S » = Échantillon

Figure 1. Cartouche Xpert Flu Assay (vue de dessus)

Démarrage du test

Important : Avant de démarrer le test, assurez-vous que le fichier de définition du test Xpert Flu Assay est importé dans le logiciel. Cette section répertorie les étapes de base de la réalisation du test à l'aide du GeneXpert DX System. Pour obtenir des instructions détaillées, consultez le *Manuel d'utilisation du GeneXpert Dx System* correspondant.

1. Allumez l'ordinateur, puis mettez l'appareil GeneXpert Dx sous tension.
2. Sur le bureau Windows®, double-cliquez sur l'icône de raccourci GeneXpert Dx.
3. Ouvrez une session du logiciel GeneXpert Dx System en utilisant votre nom d'utilisateur et votre mot de passe.
4. Dans la fenêtre du GeneXpert Dx System, cliquez sur **Create Test (Créer un test)**. La boîte de dialogue Scan Cartridge Barcode (Lire le code-barres de la cartouche) s'affiche.
5. Scannez le code-barres sur la cartouche Xpert Flu Assay. La fenêtre **Create Test (Créer un test)**s'affiche. En utilisant les informations du code-barres, le logiciel complète automatiquement les cases des champs suivants : Select Assay (Sélectionner le test), Reagent Lot ID (Numéro d'identification du lot de réactifs) et Cartridge SN (NS de la cartouche).
6. Dans la case **Sample ID (Numéro d'identification de l'échantillon)**, scannez ou saisissez le numéro d'identification de l'échantillon. Assurez-vous de bien saisir le numéro d'identification du bon échantillon. Le numéro d'identification de l'échantillon est associé au résultat du test et il est affiché dans la fenêtre « **View Results (Afficher les résultats)** » et dans tous les rapports.
7. Cliquez sur **Start Test (Démarrer le test)**. Dans la boîte de dialogue qui s'affiche, saisissez votre mot de passe.
8. Ouvrez la porte du module de l'appareil dont le voyant vert clignote et chargez la cartouche.
9. Fermez la porte. Le test démarre et le voyant vert cesse de clignoter. Lorsque le test est terminé, le voyant s'éteint.
10. Attendez que le système déverrouille la porte du module avant de l'ouvrir et de retirer la cartouche.
11. Les cartouches usagées doivent être jetées dans les conteneurs prévus à cet effet, conformément aux pratiques habituelles de votre institution.

Affichage et impression des résultats

Pour obtenir des instructions détaillées sur la manière d'afficher et d'imprimer les résultats, consultez le *Manuel d'utilisation du GeneXpert Dx System.*

CONTROL

Contrôle qualité

Chaque test comprend un contrôle du traitement de l'échantillon (CTE) et un contrôle de la sonde.

Contrôle du traitement de l'échantillon (CTE) : vérifie que l'échantillon a été correctement traité. Le CTE est un Armored RNA® (ARN encapsidé) sous forme de billes de réactifs ; il est inclus dans chaque cartouche afin de vérifier le bon déroulement du traitement de l'échantillon du virus. Le CTE vérifie que la lyse de virus de la grippe a eu lieu si l'organisme est présent et contrôle que le traitement de l'échantillon est adéquat. En outre, ce contrôle détecte l'inhibition associée à l'échantillon des réactions RT-PCR et PCR. Le CTE doit être positif dans un échantillon négatif et peut être négatif ou positif dans un échantillon positif. Le CTE réussit s'il répond aux critères d'acceptation validés.

Contrôle de la sonde : avant de démarrer la réaction PCR, le GeneXpert Dx System mesure le signal de fluorescence provenant des sondes, afin de contrôler la réhydratation des billes de réactifs, le remplissage des tubes réactionnels, l'intégrité de la sonde et la stabilité du fluorochrome. Le CTE réussit s'il répond aux critères d'acceptation validés.

Contrôles externes : les contrôles externes doivent être utilisés en accord avec les dispositions des organisations d'accréditation locales, nationales et fédérales en vigueur.

Interprétation des résultats

Les résultats sont interprétés automatiquement par le GeneXpert Dx System à partir de signaux fluorescents mesurés et d'algorithmes de calcul intégrés. Ils seront affichés dans la fenêtre « **View Results** » (Afficher les résultats). Les résultats possibles sont :

Flu A POSITIVE ; 2009 H1N1 NOT DETECTED ; Flu B NEGATIVE (Figure 2)

ARN cible de la grippe A détecté ; ARN H1N1 2009 non détecté ; ARN cible de la grippe B non détecté.

- ARN cible de la grippe A présente un Ct compris dans la gamme valide et sa valeur finale se situe au-dessus de la valeur finale minimale requise.
- CTE (SPC) : NA (Sans objet) ; le CTE est ignoré parce que l'amplification de la cible de la grippe A peut s'opposer à lui.
- Probe Check : PASS (Contrôle de la sonde réussi) ; tous les résultats du contrôle de la sonde sont bons.

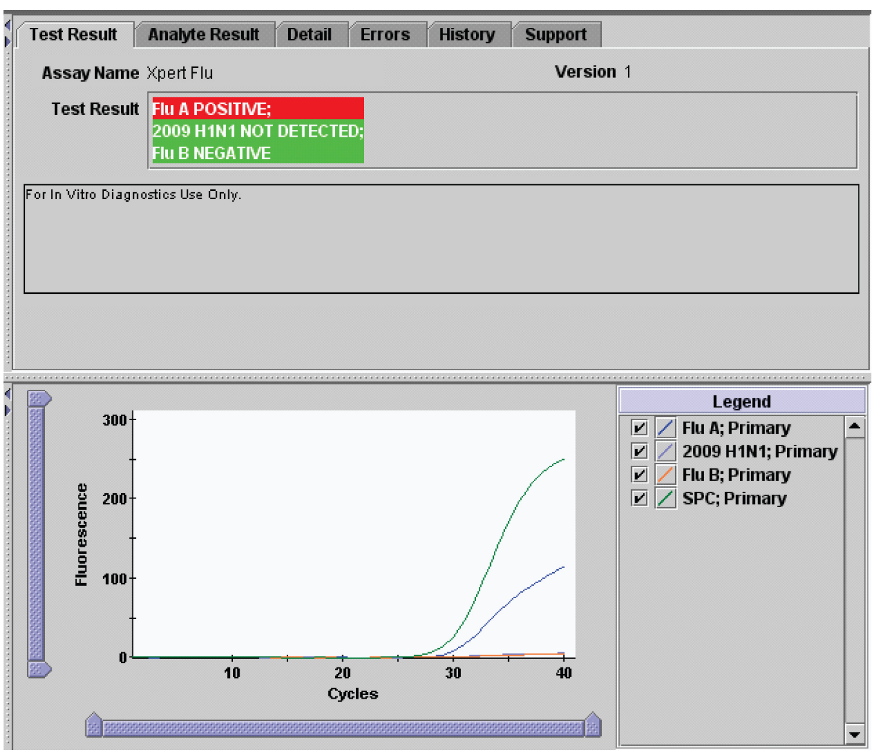


Figure 2. Exemple de résultat positif à la grippe A

Flu A POSITIVE ; 2009 H1N1 DETECTED ; Flu B NEGATIVE (Figure 3)

ARN cible de la grippe A détecté ; ARN H1N1 2009 détecté; ARN cible de la grippe B cible non détecté.

- La cible de la grippe A présente un Ct compris dans la gamme valide et sa valeur finale se situe au-dessus de la valeur finale minimale requise.
- La cible de la grippe H1N1 2009 présente un Ct compris dans la gamme valide et sa valeur finale se situe au-dessus de la valeur finale minimale requise.
- CTE (SPC) : NA (Sans objet) ; le CTE est ignoré parce que l'amplification de la cible de la grippe A et du H1N1 2009 cible peut s'opposer à lui.
- Probe Check : PASS (Contrôle de la sonde réussi) ; tous les résultats du contrôle de la sonde sont bons.

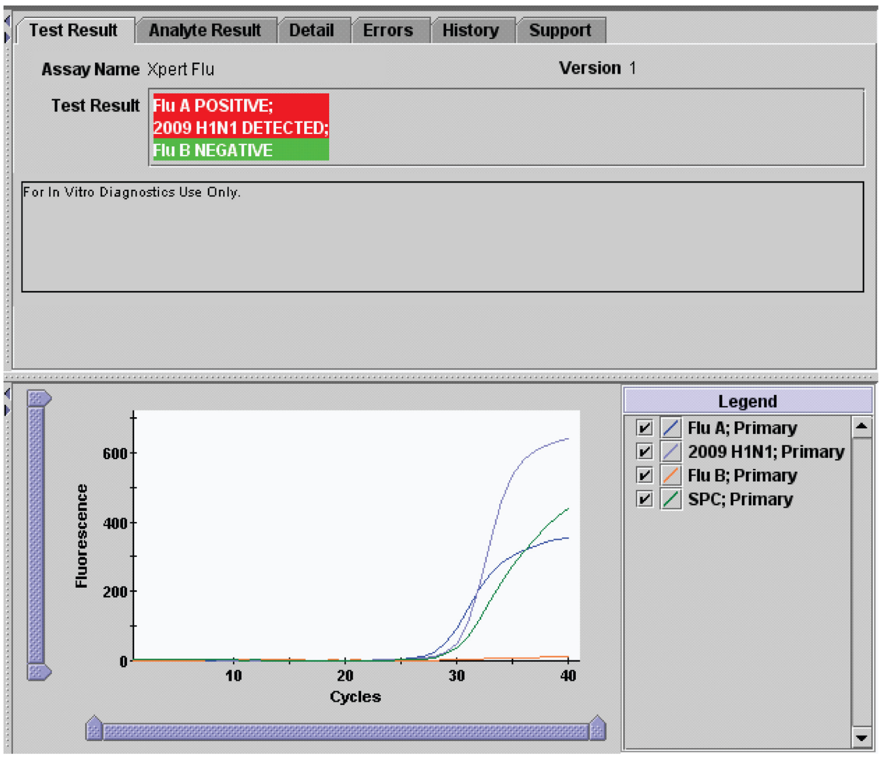


Figure 3. Exemple de résultat positif à la grippe HN 2009

Flu A NEGATIVE ; 2009 H1N1 NOT DETECTED ; Flu B POSITIVE (Figure 4)

ARN cible de la grippe B détecté ; ARN grippe A non détecté ; ARN cible du H1N1 2009 non détecté.

- La cible de la grippe B présente un Ct compris dans la gamme valide et sa valeur finale se situe au-dessus de la valeur finale minimale requise.
- CTE (SPC) : NA (Sans objet) ; le CTE est ignoré parce que l'amplification de la cible de la grippe B peut s'opposer à lui.
- Probe Check : PASS (Contrôle de la sonde réussi) ; tous les résultats du contrôle de la sonde sont bons.

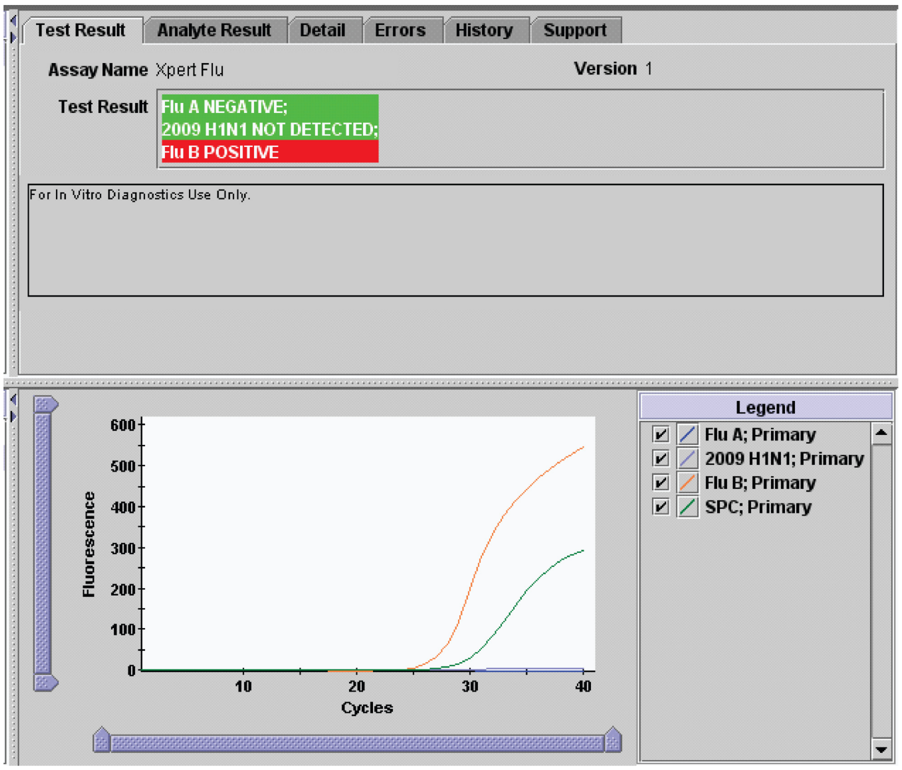


Figure 4. Exemple de résultat positif à la grippe B

Flu A NEGATIVE ; 2009 H1N1 NOT DETECTED ; Flu B NEGATIVE (Figure 5)

ARN cible de la grippe A non détecté ; ARN H1N1 2009 non détecté et ARN cible de la grippe B non détecté. Le CTE satisfait aux critères d'acceptation.

- La grippe, les ARN cibles du H1N1 2009 et de la grippe B ne sont pas détectés.
- SPC : PASS (CTE réussi) : le CTE présente un Ct compris dans la gamme valide et sa valeur finale se situe au-dessus de la valeur finale minimale requise.
- Probe Check : PASS (Contrôle de la sonde réussi) ; tous les résultats du contrôle de la sonde sont bons.

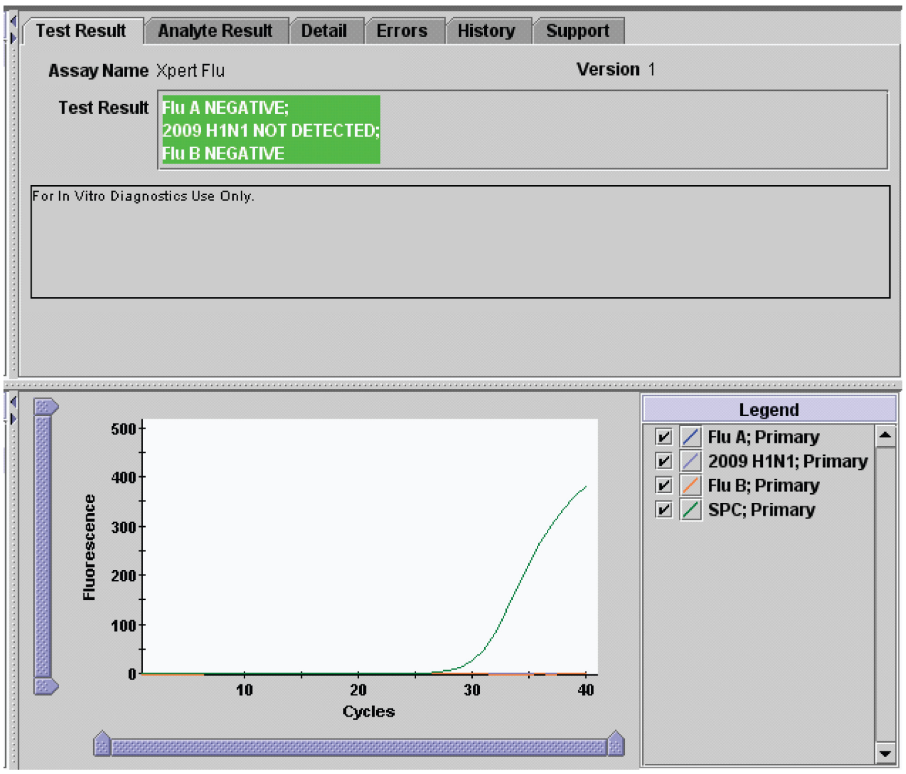


Figure 5. Exemple de résultat négatif

INVALID (Non valide) (Figures 6 et 7)

1. Le CTE ne répond pas aux critères d'acceptation. Impossible de déterminer la présence ou l'absence des ARN cibles. Répétez le test selon les instructions de la section Procédure de nouveau test, ci-après.
   - SPC - FAIL (CTE : échec) : le résultat cible du CTE est négatif ; le Ct du CTE n'est pas compris dans la gamme valide et sa valeur finale se situe en dessous de la valeur finale minimale requise.
   - Probe Check : PASS (Contrôle de la sonde réussi) ; tous les résultats du contrôle de la sonde sont bons.

ou

2. Impossible de déterminer la présence ou l'absence de l'ARN cible du H1N1 2009. Répétez le test selon les instructions de la section Procédure de nouveau test, ci-après.
   - ARN cible de la grippe A non détecté et ARN cible du H1N1 2009 détecté.
   - SPC (CTE) : NA (Sans objet) ; le CTE est ignoré pour cause d'amplification d'une cible.
   - Probe Check : PASS (Contrôle de la sonde réussi) ; tous les résultats du contrôle de la sonde sont bons.

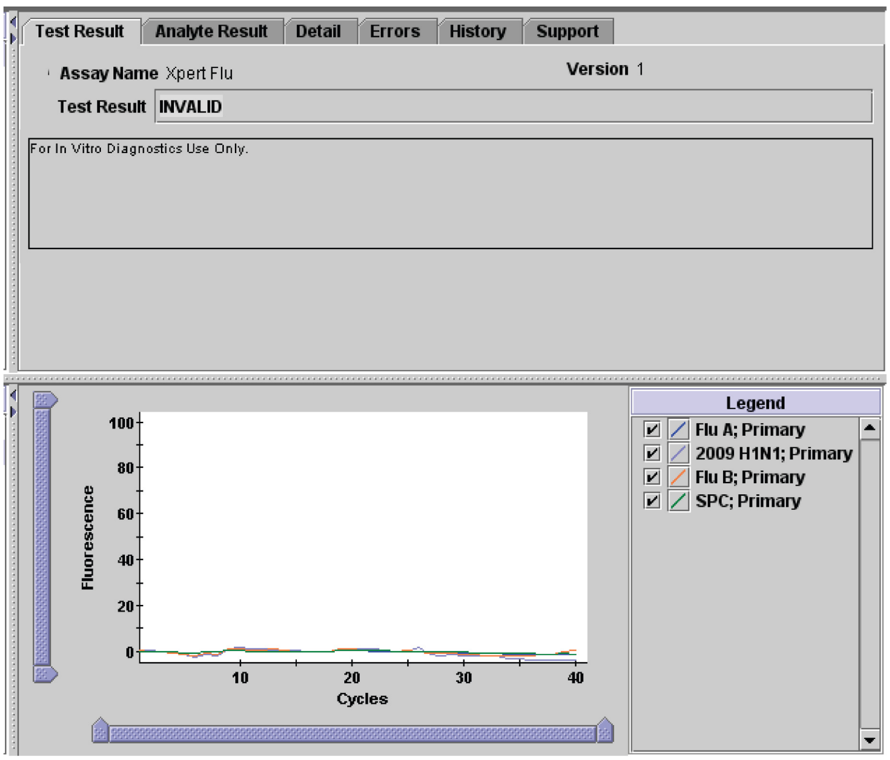


Figure 6. Exemple de résultat non valide (le CTE ne remplit pas les critères d'acceptation)

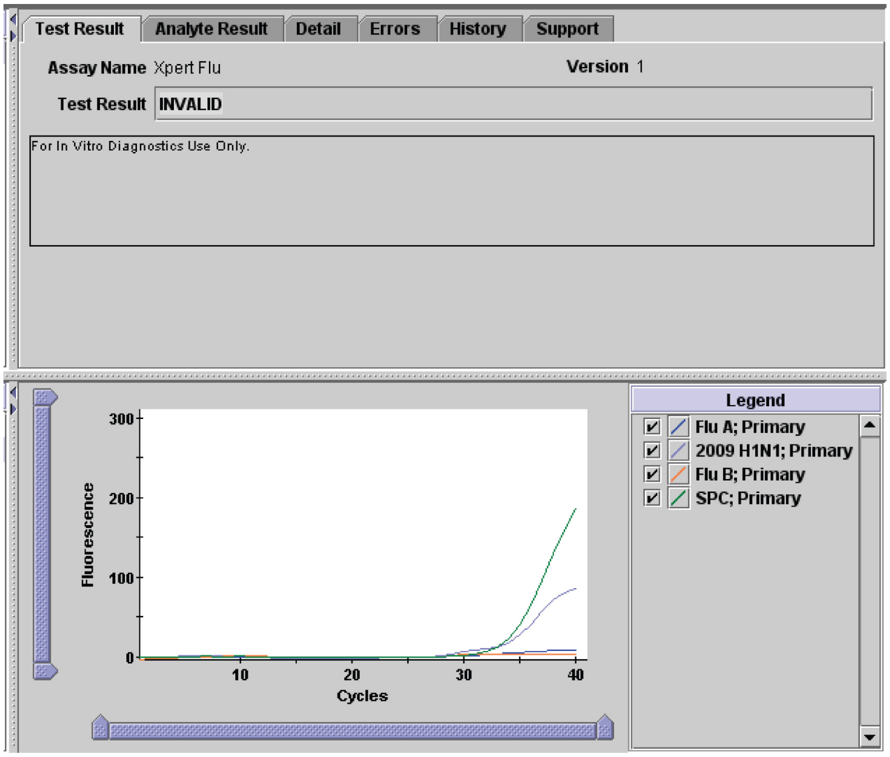


Figure 7. Exemple de résultat non valide (grippe A négatif et H1N1 2009 positif)

ERROR (Erreur)

Impossible de déterminer la présence ou l'absence des ARN cibles de la grippe A, H1N1 2009 et grippe B. Répétez le test selon les instructions de la section Procédure de nouveau test, ci-après.

- 2009 H1N1 – NO RESULT (H1N1 2009 : Pas de résultat)
- Flu A – NO RESULT (Grippe A : Pas de résultat)
- Flu B – NO RESULT (Grippe B : Pas de résultat)
- SPC – NO RESULT (CTE : Pas de résultat)
- Probe Check – FAIL* (Contrôle de la sonde : Échec*) : un ou plusieurs résultats du contrôle de la sonde sont mauvais.

*Si le contrôle de la sonde a réussi, l'erreur est provoquée par un dépassement de la limite de pression maximum ou par l'échec d'un composant du système.

NO RESULT (Pas de résultat)

Impossible de déterminer la présence ou l'absence des ARN cibles de la grippe A, H1N1 2009 et grippe B. Répétez le test selon les instructions de la section Procédure de nouveau test ci-après. Le résultat NO RESULT (Pas de résultat) indique que trop peu de données ont été collectées. Par exemple, l'opérateur a interrompu un test en cours.

- 2009 H1N1 – NO RESULT (H1N1 2009 : Pas de résultat)
- Flu A – NO RESULT (Grippe A : Pas de résultat)
- Flu B – NO RESULT (Grippe B : Pas de résultat)
- SPC – NO RESULT (CTE : Pas de résultat)
- Probe Check – NA (not applicable) (Contrôle de la sonde - SO (Sans objet))

Raisons pour lesquelles le test doit être répété

Si l'un des résultats de test mentionnés ci-dessous se produit, répétez le test conformément aux instructions de la section Procédure de nouveau test, ci-après.

- Un résultat INVALID (Non valide) indique qu'au moins l'un des événements suivants s'est produit :
  - Le CTE a échoué ;
  - L'ARN cible de la grippe A n'a pas été détecté et l'ARN cible du H1N1 2009 a été détecté ;
  - L'échantillon n'a pas été traité correctement ou la PCR a été inhibée.
- Un résultat ERROR (Erreur) indique que le test a été interrompu. Les causes possibles incluent : le tube de réaction a été rempli de façon incorrecte ; un problème d'intégrité de la sonde de réactif a été détecté ; ou la pression maximale a été dépassée.
- Le résultat NO RESULT (Pas de résultat) indique que trop peu de données ont été collectées. Par exemple, l'opérateur a interrompu un test en cours ou une coupure de courant s'est produite.

Procédure de nouveau test

Pour répéter un test indéterminé, utilisez une nouvelle cartouche (ne réutilisez pas la même cartouche) et de nouveaux réactifs.

Pour les échantillons RP, utilisez les 300 µl d'échantillon restant dans le tube UTM d'origine.

Pour les échantillons A/LN, utilisez les 300 µl d'échantillon dilué restant dans le tube UTM de 3 ml.

1. Ôtez une nouvelle cartouche de l'emballage.
2. Mélangez l'échantillon en retournant cinq fois le tube.
3. Ouvrez le couvercle de la cartouche. Utilisez une pipette de transfert propre de 300 µl (fournie) et transférez 300 µl de l'échantillon dilué dans la chambre marquée « S » de la cartouche.
4. Versez le réactif de fixation 1 dans la chambre 1 de la cartouche. Pressez l'ampoule jusqu'à ce que tout le contenu soit ajouté à la cartouche.
5. Fermez le couvercle de la cartouche.

Restrictions

- Les résultats du test Xpert Flu Assay ont été validées en utilisant uniquement les procédures fournies dans cette notice. Des modifications apportées à ces procédures peuvent modifier les résultats du test.
- Les résultats du test Xpert Flu Assay doivent être interprétés conjointement avec d'autres données cliniques et de laboratoire à la disposition du clinicien.
- Des résultats de test erronés peuvent résulter d'une collecte d'échantillon inadéquate (ne suivant pas la procédure de collecte d'échantillon recommandée), de procédures de manipulation et de stockage inadéquates, d'une erreur technique, d'une confusion d'échantillons ou d'un nombre d'organismes dans l'échantillon insuffisant pour permettre une détection. Il est nécessaire de respecter scrupuleusement les instructions de cette notice pour éviter les résultats erronés.
- Une viscosité très élevée des échantillons, causée par l'ajout de 1,5 % (m/v) et 2,5 % (m/v) de mucine, peut entraîner des faux négatifs dans les résultats des tests réalisés avec Xpert Flu Assay. L'inhibition du test Xpert Flu Assay a également été observée en cas d'ajout de 1 % (m/v) de mucine résultant d'une détection retardée de la grippe A, du sous-type de grippe A H1N1 de 2009 et de la grippe B.

Caractéristiques des performances

Performances cliniques

Les caractéristiques des performances du test Xpert Flu Assay sur des échantillons archivés ont été évaluées par deux institutions aux États-Unis.

Les sujets comprenaient des individus dont les soins de routine exigeaient des échantillons A/LN ou RP pour des tests sur la grippe. Pour les sujets admissibles, des aliquots d'échantillons inutilisés ont été obtenus pour test avec Xpert Flu Assay et tests de référence.

Les résultats du test Xpert Flu Assay ont été calculés par rapport aux résultats de référence (culture virale suivie d'un test de fluorescence directe, DFA, avec confirmation de séquence de tous les échantillons positifs à la grippe A), pour les échantillons ayant fait l'objet d'une culture virale avant congélation. Pour les échantillons n'ayant pas fait l'objet de culture virale avant congélation, les résultats du test Xpert Flu Assay ont été déterminés par rapport aux tests et séquences ProFlu+™ de Prodesse. Tous les échantillons positifs de la grippe A identifiés par culture virale ou test ProFlu+ sont séquencés afin de différencier la grippe A H1N1 de 2009 et les autres sous-types de grippe A.

Résultats généraux

Au total, 270 échantillons RP archivés ont été testés pour la grippe A, le sous-type de grippe A H1N1 de 2009 et la grippe B avec le test Xpert Flu Assay et une culture. Au total, 357 échantillons A/LN archivés ont été testés pour la grippe A, le sous-type de grippe A H1N1 de 2009 et la grippe B avec les tests Xpert Flu Assay et ProFlu+. Tous les échantillons positifs à la grippe A identifiés par culture virale ou test ProFlu+ ont été séquencés afin de différencier la grippe A H1N1 de 2009 et les autres sous-types de grippe A.

Pour les échantillons RP, le test Xpert Flu Assay a démontré une sensibilité et une spécificité de détection de la grippe A de 97,5 % et 100 %, respectivement, par rapport à la culture virale plus DFA, avec une confirmation de séquence de tous les isolats positifs à la grippe A (Tableau 1). La sensibilité et la spécificité du test Xpert Flu Assay pour le sous-type de la grippe A H1N1 de 2009 sur échantillons RP étaient respectivement de 100 % et 100 % (Tableau 2). La sensibilité et la spécificité du test Xpert Flu Assay pour la grippe B sur échantillons RP étaient respectivement de 93,8 % et 99,6 % (Tableau 3).

Tableau 1. Résultats du test Xpert Flu Assay par rapport à la méthode de référence sur échantillons RP – Grippe A

		Culture virale + DFA		
		Pos	**Nég**	**Total**
Xpert Flu Assay	**Pos**	115	0	115
	Nég	3	152	155
	Total	118	152	270
		Sensibilité :	97,5 % (95 % du CI : 92,8-99,5)	
		Spécificité :	100 % (95 % du CI : 97,6-100)	
		Précision :	98,9 % (95 % du CI : 96,8-99,8)	
		VPP :	100 % (95 % du CI : 96,8-100)	
		VPN :	98,1 % (95 % du CI : 94,5-99,6)	

Tableau 2. Résultats du test Xpert Flu Assay par rapport à la méthode de référence sur échantillons RP – H1N1 de 2009

		Culture virale + DFA/Séquence		
		Pos	**Nég**	**Total**
Xpert Flu Assay	**Pos**	85	0	85
	Nég	0	182	182
	Total	85	182	267
		Sensibilité :	100 % (95 % du CI : 95,6-100)	
		Spécificité :	100 % (95 % du CI : 98,0-100)	
		Précision :	100 % (95 % du CI : 98,6-100)	
		VPP :	100 % (95 % du CI : 95,6-100)	
		VPN :	100 % (95 % du CI : 98,0-100)	

Tableau 3. Résultats du test Xpert Flu Assay par rapport à la méthode de référence sur échantillons RP – Grippe B

		Culture virale + DFA		
Xpert Flu Assay		**Pos**	**Nég**	**Total**
	Pos	30	1	31
	Nég	2	237	239
	Total	32	238	270
		Sensibilité :	93,8 % (95 % du CI : 79,2-99,2)	
		Spécificité :	99,6 % (95 % du CI : 97,7-100)	
		Précision :	98,9 % (95 % du CI : 96,8-99,8)	
		VPP :	96,8 % (95 % du CI : 83,3-99,9)	
		VPN :	99,2 % (95 % du CI : 97,0-99,9)	

Par rapport au test ProFlu+ avec confirmation de séquence de tous les isolats positifs à la grippe A, le test Xpert Flu Assay a identifié 99,2 % des échantillons A/LN positifs à la grippe A et 100 % des échantillons négatifs à la grippe A (Tableau 4). Le test Xpert Flu Assay a identifié 97,9 % des échantillons A/LN positifs à la grippe A H1N1 de 2009 et 100 % des échantillons négatifs à la grippe A H1N1 de 2009 (Tableau 5). Le test Xpert Flu Assay a identifié 100 % des échantillons A/LN positifs à la grippe B et 100 % des échantillons négatifs à la grippe B (Tableau 6).

Tableau 4. Résultats du test Xpert Flu Assay par rapport à la méthode de référence sur échantillons A/LN – Grippe A

		ProFlu+		
Xpert Flu Assay		**Pos**	**Nég**	**Total**
	Pos	125	0	125
	Nég	1	231	232
	Total	126	231	357
		Sensibilité :	99,2 % (95 % du CI : 95,7-100)	
		Spécificité :	100 % (95 % du CI : 98,4-100)	
		Précision :	99,7 % (95 % du CI : 98,5-100)	
		VPP :	100 % (95 % du CI : 97,1-100)	
		VPN :	99,6 % (95 % du CI : 97,6-100)	

Tableau 5. Résultats du test Xpert Flu Assay par rapport à la méthode de référence sur échantillons A/LN – H1N1 de 2009

Xpert Flu Assay	ProFlu+ / Séquence			
		Pos	**Nég**	**Total**
	Pos	94	0	94
	Nég	2	261	263
	Total	96	261	357
	Sensibilité :	97,9 % (95 % du CI : 92,7-99,8)		
	Spécificité :	100 % (95 % du CI : 98,6-100)		
	Précision :	99,4 % (95 % du CI : 98,0-99,9)		
	VPP :	100 % (95 % du CI : 96,1-100)		
	VPN :	99,2 % (95 % du CI : 98,6-100)		

Tableau 6. Résultats du test Xpert Flu Assay par rapport à la méthode de référence sur échantillons A/LN – Grippe B

Xpert Flu Assay	ProFlu+			
		Pos	**Nég**	**Total**
	Pos	40	0	40
	Nég	0	317	317
	Total	40	317	357
	Sensibilité :	100 % (95 % du CI : 91,2-100)		
	Spécificité :	100 % (95 % du CI : 98,8-100)		
	Précision :	100 % (95 % du CI : 99,0-100)		
	VPP :	100 % (95 % du CI : 91,2-100)		
	VPN :	100 % (95 % du CI : 98,8-100)		

Sur tous les test pratiqués avec Xpert Flu Assay sur des échantillons RP éligibles, 98,9 % (267/270) ont réussi dès la première tentative. Les 3 échantillons restants ont obtenu des résultats indéterminés lors de la première tentative (1 INVALID (Non valide) et 2 ERROR (Erreur)). Ces 3 échantillons ont donné un résultat à la seconde tentative. Sur tous les tests pratiqués avec Xpert Flu Assay sur des échantillons A/LN éligibles, 95,5 % (342/358) ont réussi dès la première tentative. Les 16 échantillons restants ont obtenu des résultats indéterminés lors de la première tentative (4 INVALID (Non valide), 11 ERROR (Erreur) et 1 NO RESULT (Pas de résultat)). Quinze de ces 16 échantillons ont donné un résultat à la seconde tentative.

Performances analytiques

Sensibilité analytique (limite de détection)

Des études ont été menées pour déterminer des niveaux de confiance de 95 % pour la limite de détection analytique (LDD) de 2 souches de grippe A saisonnière (H1N1), 2 souches de grippe A saisonnière (H3N2), 5 souches de grippe A H1N1 2009 et 2 souches de grippe B diluées dans une matrice rhino-pharyngée simulée. La matrice simulée consistait en 1 % de sang humain, 2,5 % de mucine et 0,85 % de chlorure de sodium. La limite de détection est définie comme la concentration la plus faible (dose infectieuse en culture tissulaire DICT $_{50}$/ml) par échantillon qui peut être détectée à plusieurs reprises dans des échantillons négatifs avec un niveau de confiance de 95 % ou la concentration la plus basse à laquelle 19 réplicats sur 20 étaient positifs. Chaque souche a été testée dans des réplicats à 20 % de concentration de virus.

L'estimation et les intervalles de confiance ont été déterminés en utilisant la régression logistique avec des données (nombre de résultats positifs par nombre de réplicats à chaque niveau) sur la gamme des concentrations testées. Les intervalles de confiance ont été déterminés en utilisant les estimations de probabilités maximales sur les paramètres du modèle logistique en utilisant la matrice de variance-covariance. Les estimations du point de LDD et les intervalles de confiance à 95 % supérieurs et inférieurs pour chaque souche testée sont résumés dans les tableaux 7 à 10.

Tableau 7. Intervalles de confiance à 95 % pour LDD analytique – Grippe saisonnière A H1N1

ID Souche–Grippe A H1N1	Inférieure à 95 % CI	LDD (DICT$_{50}$/ml)	Supérieure à 95 % CI
Grippe A/H1/Brisbane/59/07	1.0	1.3	1.9
Grippe A/H1/Nouvelle Calédonie/20/1999	5.9	7.3	11.7

Tableau 8. Intervalles de confiance à 95 % pour LDD analytique – Grippe saisonnière A H3N2

ID Souche–Grippe A H3N2	Inférieure à 95 % CI	LDD (DICT$_{50}$/ml)	Supérieure à 95 % CI
Grippe A/H3/Brisbane/10/07	2.1	2.5	3.3
Grippe A/H3/Wisconsin/67/05	5.0	5.9	7.9

Tableau 9. Intervalles de confiance à 95 % pour LDD analytique – Grippe A H1N1 de 2009

ID souche–H1N1 2009	Inférieure à 95 % CI	LDD (DICT$_{50}$/ml)	Supérieure à 95 % CI
Grippe A/PorcineNY/01/2009	1.1	1.4	2.1
Grippe A/PorcineNY/02/2009	4.0	4.8	7.3
Grippe A/PorcineNY/03/2009	3.3	3.5	4.1
Grippe A/Canada/6294	66.3	77.1	105.4
Grippe A/WI/629-S1/2009	15.0	16.2	19.1

Tableau 10. Intervalles de confiance à 95 % pour LDD analytique – Grippe B

ID Souche–Grippe A H1N1	Inférieure à 95 % CI	LDD (DICT$_{50}$/ml)	Supérieure à 95 % CI
Grippe B/Floride/02/06	1.2	1.5	2.2
Grippe B/Floride/07/04	41.3	50.6	72.9

Spécificité analytique (Réactivité croisée)

La spécificité analytique du test Xpert Flu a été évaluée en testant un panel de 40 cultures composées de 18 souches virales, 21 souches bactériennes et 1 souche de levure, représentant des pathogènes respiratoires communs ou ceux potentiellement rencontrés dans le rhinopharynx. Trois réplicats de toutes les souches bactériennes et de levure ont été testés à des concentration de ≥10^6 souches/ml. Trois réplicats de tous les virus ont été testés à des concentrations de ≥10^4 DICT$_{50}$/ml. Des témoins positifs et négatifs étaient inclus dans l'étude. La spécificité analytique était de 100 %. Les résultats sont indiqués dans le Tableau 11.

Tableau 11. Spécificité analytique du test Xpert Flu Assay

Souche	Concentration (par cartouche)	Grippe A	Grippe A H1N1 2009	Grippe B
Témoin positif 1 – Grippe A/Grippe B	S/O	+	-	+
Témoin positif 2 – Grippe A H1N1 2009	S/O	+	+	-
Témoin négatif	S/O	-	-	-
Adénovirus Type 7A	1×10^6 $DICT_{50}$/ml	-	-	-
Adénovirus Type 1	1×10^6 $DICT_{50}$/ml	-	-	-
Coronavirus humain 229E	1×10^6 $DICT_{50}$/ml	-	-	-
Coronavirus humain OC43	1×10^4 $DICT_{50}$/ml	-	-	-
Cytomégalovirus*	1×10^5 copies/ml	-	-	-
Entérovirus Type 71	1×10^6 $DICT_{50}$/ml	-	-	-
Virus d'Epstein-Barr	1×10^5 $DICT_{50}$/ml	-	-	-
Para-influenza Type 1	1×10^5 $DICT_{50}$/ml	-	-	-
Para-influenza Type 2	1×10^6 $DICT_{50}$/ml	-	-	-
Para-influenza Type 3	1×10^6 $DICT_{50}$/ml	-	-	-
Virus de la rougeole	1×10^6 $DICT_{50}$/ml	-	-	-
Métapneumovirus humain	1×10^6 $DICT_{50}$/ml	-	-	-
Virus des oreillons	1×10^6 $DICT_{50}$/ml	-	-	-
Virus respiratoire syncitial A	1×10^6 $DICT_{50}$/ml	-	-	-
Virus respiratoire syncitial B	1×10^6 $DICT_{50}$/ml	-	-	-
VHS humain Type 1	1×10^6 $DICT_{50}$/ml	-	-	-
Rhinovirus humain Type 4	1×10^6 $DICT_{50}$/ml	-	-	-
Échovirus 11	1×10^6 $DICT_{50}$/ml	-	-	-
*Bordetella pertussis**	1×10^6 copies/ml	-	-	-
Chlamydia pneumoniae	1×10^6 souches/ml	-	-	-
Corynebacterium xerosis	1×10^6 souches/ml	-	-	-
Escherichia coli	1×10^6 souches/ml	-	-	-
Proteus vulgaris	1×10^6 souches/ml	-	-	-
Proteus mirabilis	1×10^6 souches/ml	-	-	-
Klebsiella pneumoniae	1×10^6 souches/ml	-	-	-
Haemophilus influenzae	1×10^6 copies/ml	-	-	-
Lactobacillus crispatus	1×10^6 souches/ml	-	-	-
Legionella pneumophila	1×10^6 souches/ml	-	-	-
Moraxella catarrhalis	1×10^6 souches/ml	-	-	-
Mycobacterium tuberculosis (souche BCG)	1×10^6 souches/ml	-	-	-
Mycoplasma pneumoniae	1×10^6 souches/ml	-	-	-
Neisseria meningitidis	1×10^6 souches/ml	-	-	-
Neisseria Cinneria	1×10^6 souches/ml	-	-	-
Pseudomonas aeruginosa	1×10^6 souches/ml	-	-	-
Staphylocoque doré	1×10^6 souches/ml	-	-	-
Staphylococcus epidermidis	1×10^6 souches/ml	-	-	-
Streptococcus pneumoniae	1×10^6 souches/ml	-	-	-
Streptococcus pyogenes	1×10^6 souches/ml	-	-	-
Streptococcus salivarius	1×10^6 souches/ml	-	-	-
Candida albicans	1×10^6 souches/ml	-	-	-

*L'acide nucléique a été testé pour le cytomégalovirus et Bordetella pertussis.

Réactivité analytique (inclusivité)

La réactivité analytique du test Xpert Flu Assay a été évaluée par rapport à de nombreuses souches de grippe A (sous-types H1N1, H3N2, H5N2, H5N1 et H7N3), de grippe A H1N1 2009 et de grippe B. Parmi celles-ci, ont été inclus le sous-type H1N1 de la grippe A (12), le sous-type H3N2 de la grippe A (7), le sous-type H1N1 2009 de la grippe A (6), le sous-type H5N1 de la grippe A (1), le sous-type H5N2 de la grippe A (1), le sous-type H7N3 de la grippe A (1) et la grippe B (11). Trois réplicats de chaque souche virale ont été testés à 5 – 500 $DICT_{50}$/ml. Les résultats sont indiqués dans le Tableau 12.

Tableau 12. Réactivité analytique (inclusivité) du test Xpert Flu Assay

Souche virale	Concentration ($DICT_{50}$/ml)	Grippe A	Grippe A H1N1 2009	GrippeB
Grippe A/Denver/1/57 (H1N1)	500	+	-	-
Grippe A/NewYork/55/2004 (H1N1)	500	+	-	-
Grippe A/Mal/302/54 (H1N1)	50	+	-	-
Grippe A/New Jersey/8/76 (H1N1)	500	+	-	-
Grippe A/NWS/33/2004 (H1N1)	5	+	-	-
Grippe A/PR/8/34 (H1N1)	500	+	-	-
Grippe A/Taiwan/42/57 (H1N1)	500	+	-	-
Grippe A/WS/33 (H1N1)	5	+	-	-
Grippe A/Porcine/1976/31 (H1N1 porcin)	500*	+	-	-
Grippe A/Porcine/Iowa/15/30 (H1N1 porcin)	500*	+	-	-
Grippe A/Brisbane/59/07 (H1N1)	5	+	-	-
Grippe A/Nouvelle Calédonie/20/1999 (H1N1)	50	+	-	-
Grippe A/Victoria/3/75 (H3N2)	500	+	-	-
Grippe A/Aichi2/68 (H3N2)	500	+	-	-
Grippe A/Hong Kong/8/68 (H3N2)	50	+	-	-
Grippe A/Hawaï/15/2001 (H3N2)	500	+	-	-
Grippe A/Port Chalmers/1/73 (H3N2)	500	+	-	-
Grippe A/Brisbane/10/07 (H3N2)	10	+	-	-
Grippe A/Wisconsin/67/05 (H3N2)	10	+	-	-
Grippe A/PorcineNY/01/2009 (09 H1N1)	10	+	+	-
Grippe A/PorcineNY/02/2009 (09 H1N1)	100	+	+	-
Grippe A/PorcineNY/03/2009 (09 H1N1)	10	+	+	-
Grippe A/Californie/4/2009 (09 H1N1)	5	+	+	-
Grippe A/Canada/6294 (09 H1N1)	500	+	+	-
Grippe A/WI/929-S1 (09 H1N1)	100	+	+	-
Grippe A/Mallard/WI/34/75 (H5N2)	3 pg/µl^^	+	-	-
Grippe A/Anhui/02/2005/PR8-IBCDC-RG5 (H5N1)	0,122 pg/µl^^	+	-	-
Grippe A/aviaire/NJ/15086-3/94 (H7N3)	5 pg/µl^^	+	-	-
Grippe B/Allen/45	500	-	-	+
Grippe B/Floride/02/06	10	-	-	+
Grippe B/Floride/04/06	500	-	-	+
Grippe B/Floride/07/04	50	-	-	+
Grippe B/GL/1739/54	500	-	-	+
Grippe B/Hong Kong/5/72	500	-	-	+
Grippe B/Lee/40	500	-	-	+
Grippe B/Malaisie/2506/04	500	-	-	+
Grippe B/Maryland/1/59	500	-	-	+
Grippe B/Panama/45/90	500	-	-	+
Grippe B/Taiwan/2/62	50^	-	-	+

* Concentration exprimée en PFU/ml ; ^concentration exprimée en DIE50/ml ; ^^concentration exprimée en picogrammes/µl.

Étude des substances parasites

Dans une étude non clinique, les substances potentiellement parasites pouvant être présentes dans le rhinopharynx ont été directement évaluées par rapport aux résultats du test Xpert Flu Assay. Les substances exogènes potentiellement parasites dans le rhinopharynx peuvent inclure, sans s'y limiter : sang, sécrétions nasales ou mucus et médicaments pour la gorge et le nez, utilisés pour soulager la congestion, la sécheresse nasale, l'irritation ou l'asthme et les symptômes allergiques. Ces substances sont énumérées au Tableau 13 avec indication des ingrédients actifs et des concentrations testés. Une viscosité très élevée des échantillons, causée par l'ajout de 1,5 % (m/v) et 2,5 % (m/v) de mucine, peut entraîner des faux négatifs dans les résultats des tests réalisés avec Xpert Flu Assay. L'inhibition du test Xpert Flu Assay a également été observée en cas d'ajout de 1 % (m/v) de mucine résultant d'une détection retardée de la grippe A, du sous-type de grippe A H1N1 de 2009 et de la grippe B.

Tableau 13. Substances potentiellement parasites dans le test Xpert Flu Assay

Substance	Description/Ingrédient actif	Concentration testée
Sang (humain)	S/O	2 % (v/v)
Mucine	Protéine de mucine purifiée (glande sous-maxillaire bovine ou porcine)	2,5 %, 1,5 %, 1 % et 0,5 % (m/v)
Gouttes nasales Neo-Synephrine®	Phényléphrine HCl	15 % (v/v)
Spray nasal Anefrin	Chlorydrate d'oxymétazoline	15 % (v/v)
Gel nasal Zicam®	Luffa opperculata, Galphimia glauca, Histaminum hydrochloricum Sulfur	5 % (v/v)
Spray nasal salin	Chlorure de sodium avec agents de conservation	15 % (v/v)
Onguent nasal antibiotique	Mupirocine	10 mg/ml
Antibactérien systémique	Tobramycine	4,0 µg/ml
Pastilles pour la gorge, anesthésique et analgésique	Menthol	1,7 mg/ml de menthol

Étude de contamination (carry-over)

Une étude a été menée pour démontrer que les cartouches GeneXpert indépendantes à usage unique empêchent la contamination (carry-over) des échantillons négatifs analysés après des échantillons positifs à très haute concentration dans le même module GeneXpert. L'étude a consisté à traiter un échantillon négatif dans le même module GeneXpert immédiatement après un échantillon fortement concentré en grippe A, sous-type H1N1 2009 (environ 10^6 $DICT_{50}$/test) ou en grippe B (environ 10^6 $DICT_{50}$/test). Ce test a été répété 20 fois sur 4 modules GeneXpert, pour un total de 88 tests résultant en 40 échantillons positifs et 48 négatifs. Les 40 échantillons positifs ont été correctement déclarés positifs à la grippe A H1N1 2009 ou à la grippe B. Les 48 échantillons négatifs ont été correctement déclarés négatifs à la grippe A, H1N1 2009 non détecté et négatifs à la grippe B.

Reproductibilité

Une série de 10 échantillons à des concentrations variées de grippe A, grippe B et grippe A sous-type H1N1 2009 ont été testés en deux exemplaires pendant 10 jours distincts sur chacun des trois sites (10 échantillons × 2 fois/jour × 10 jours × 3 sites). Un lot du test Xpert Flu Assay a été utilisé sur chacun des 3 sites de test. Les tests Xpert Flu Assays ont été réalisés conformément à la procédure Xpert Flu Assay. Les résultats sont indiqués dans le Tableau 14.

Tableau 14. Résumé des résultats de reproductibilité[a]

N° Id de l'échantillon	Site 1	Site 2	Site 4	% accord total par échantillon
Négatif	100 % (20/20)	100 % (20/20)	100 % (20/20)	100 % (60/60)
Grippe A positif moyen	100% (20/20)	100 % (19/19)[b]	100 % (20/20)	100 % (59/59)
Grippe A positif faible	100 % (20/20)	100 % (20/20)	100 % (20/20)	100 % (60/60)
Grippe A négatif élevé	100 % (20/20)	95,0 % (19/20)	90 % (18/20)	95,0 % (57/60)
H1N1 2009 positif moyen	100 % (20/20)	100 % (20/20)	100 % (20/20)	100 % (60/60)
H1N1 2009 positif faible	100 % (20/20)	100 % (19/19)[a]	100 % (20/20)	100 % (59/59)
H1N1 2009 négatif élevé	94,7 % (18/19)[b]	100 % (20/20)	89,5 % (17/19)[b]	94,8 % (55/58)[c]
Grippe B positif moyen	100 % (20/20)	100 % (20/20)	100 % (20/20)	100 % (60/60)
Grippe B positif faible	100 % (20/20)	100 % (20/20)	100 % (20/20)	100 % (60/60)
Grippe B négatif élevé	90,0 % (18/20)	95,0 % (19/20)	55,0 % (11/20)	80,0 % (48/60)
% Accord total	98,5 % (196/199)	99,0 % (196/198)	93,5 % (186/199)	97,0 % (578/596)

[a] n=19 parce qu'un échantillon était indéterminé et n'a pas été retesté.
[b] n=19 parce que la répétition entraînait un résultat indéterminé.
[c] 9/55 échantillons négatifs au H1N1 2009 ont résulté en un positif à la grippe A car le signal Grippe A a été détecté. Un positif H1N1 2009 valide nécessite la détection des signaux Grippe A et H1N1 2009.

Références

1. Petric M, Comanor L, Petti CA. Role of the laboratory in diagnosis of influenza during seasonal epidemics and potential pandemics. J Infect Dis. 2006;194:S98-110.

2. Schweiger B, Zadow I, Heckler R, et al. Application of a fluorogenic PCR assay for typing and subtyping of influenza viruses in respiratory samples. J Clin Micro. 2000;38:1552-1558.

3. http://www.cdc.gov accès le 22 février 2010.

4. Centers for Disease Control and Prevention. Biosafety in microbiological and biomedical laboratories. Richmond JY and McKinney RW (eds) (1993). HHS Publication number (CDC) 93-8395.

5. Interim Biosafety Guidance for All Individuals Handling Clinical Specimens or Isolates Containing 2009-H1N1 Influenza A Virus (Novel H1N1), including Vaccine Strains, 15 août 2009; (http://www.cdc.gov/h1n1flu/guidelines_labworkers.htm).

6. Clinical and Laboratory Standards Institute (anciennement National Committee for Clinical Laboratory Standards). Protection of laboratory workers from occupationally acquired infections; Approved Guideline. Document M29 (refer to latest edition).

Assistance

Pour bénéficier d'une assistance, contactez Cepheid aux numéros et courriels indiqués ci-dessous. Assurez-vous de communiquer le numéro de série de l'appareil et le N° Id du lot de réactifs lorsque vous appelez ou envoyez un courrier électronique.

Amérique du Nord

Pour bénéficier d'une assistance technique :

Tél. : +1.888.838.3222

Courrier électronique : techsupport@cepheid.com

Vous pouvez joindre l'assistance technique de Cepheid par téléphone du lundi au vendredi, de 5h00 à 17h00, heure du Pacifique.

Union européenne

Pour bénéficier d'une assistance technique :

Tél. : +33.563.82.53.19

Télécopie : +33.563.82.53.01

Courrier électronique : techsupport@cepheideurope.fr

Autres sites

Contactez votre représentant local Cepheid.

Tableau des symboles

Tableau 15. Signification des symboles

Symbole	Signification
REF	Référence
IVD	Appareil à usage médical de diagnostic *in vitro*
	Ne pas ré-utiliser
	Fabricant
Σ	Contenu suffisant pour <n> tests
CONTROL	Contrôle
EC REP	Représentant agréé au sein de la Communauté européenne
+2 +28 °C	Limitation de la température
	Risque biologique

Fabricant

Cepheid
904 Caribbean Drive
Sunnyvale, CA 94089-1189

Tél. : +1.408.541.4191
Fax : +1.408.541.4192

EC REP Représentant agréé

Cepheid Europe
Vira-Solelh
81470 Maurens-Scopont
France

Tél. : +33.563.82.53.00
Fax : +33.563.82.53.01
Courrier électronique : cepheid@cepheideurope.fr

CE IVD

Deutsch

Nur für die *In-vitro*-Diagnostik.

Markenname

Xpert® Flu

Gebrauchsname

Xpert Flu Assay

Verwendungszweck

Der Cepheid® Xpert Flu Assay ist ein automatisierter Multiplex-Echtzeit-RT-PCR Assay für den qualitativen *In-Vitro*-Nachweis und die Differenzierung viraler RNA von Influenza A, Influenza B und H1N1 Influenza aus dem Jahr 2009. Der Xpert Flu Assay verwendet Nasenaspirate/Nasenspülungen (NA/W-Proben) sowie Nasopharyngealabstriche (NP-Abstriche) von Patienten mit Anzeichen und Symptomen einer respiratorischen Infektion in Verbindung mit klinischen und epidemiologischen Risikofaktoren. Der Xpert Flu Assay dient als Hilfsmittel bei der Diagnose von Influenza.

Zusammenfassung und Erläuterungen

Influenza, auch bekannt als „(Virus)Grippe", ist eine ansteckende virale Infektion der Atemwege, die häufig im Winter auftritt. Influenza wird aerogen durch zum Beispiel Husten oder Niesen übertragen (Tröpfcheninfektion). Häufig auftretende Symptome sind unter anderem Fieber, Schüttelfrost, Kopfschmerzen, Unwohlsein, Husten und verstopfte Nebenhöhlen. Ebenso kann es zu gastrointestinalen Symptomen (z.B. Übelkeit, Erbrechen oder Durchfall) kommen. Diese seltener auftretenden Symptome sind hauptsächlich bei Kindern zu beobachten. Influenza-Symptome treten im allgemeinen innerhalb von zwei Tagen nach Kontakt mit einer infizierten Person auf. Als Komplikation einer Infektion mit Influenza kann es zu einer Lungenentzündung (Pneumonie) kommen, die insbesondere bei Kindern, Senioren und Personen mit einem geschwächten Immunsystem (immunsupprimierte Personen) zu einer erhöhten Krankheitshäufigkeit (Morbidität) und Sterblichkeit (Mortalität) führt.[1,2]

Influenza-Viren werden in die Typen A, B und C unterteilt. Die meisten menschlichen Infektionen werden von den Typen A und B hervorgerufen. Influenza A ist der im Menschen am häufigsten anzutreffende Virustyp und im allgemeinen für die saisonal auftretenden Influenza-Epidemien verantwortlich. Dieser Virustyp hat das Potential, Pandemien zu verursachen. Influenza A-Viren können neben dem Menschen auch Tiere wie Vögel, Schweine und Pferde infizieren. Infektionen mit dem Influenza B-Virus sind in der Regel auf den Menschen beschränkt und verursachen seltener Epidemien. Influenza A-Viren werden anhand der zwei Oberflächen-Proteine Hämagglutinin (H) und Neuraminidase (N) in Subtypen unterteilt. Die saisonale Grippe wird normalerweise durch Kombinationen der Subtypen H1, H2, H3, N1 und N2 verursacht. Zusätzlich zu den bereits zirkulierenden saisonalen Influenza-Viren wurde Anfang 2009 der neue Stamm H1N1 im Menschen identifiziert.[3]

Aktive Überwachungsprogramme in Verbindung mit Vorsichtsmaßnahmen zur Infektionskontrolle sind wichtige Vorkehrungen zur Verhinderung einer Übertragung von Influenza. Ebenso ist die Verwendung von Assays, die schnell und zuverlässig ein infektiöses Agens in mit saisonaler und 2009 H1N1 infizierten Patienten identifizieren und differenzieren können, ein wichtiger Bestandteil zur effektiven Kontrolle, der richtigen Behandlungswahl und der Verhinderung großflächiger Ausbrüche einer Influenza.

Verfahrensprinzip

Der Xpert Flu Assay ist ein schneller automatisierter diagnostischer *In-Vitro*-Test für den qualitativen Nachweis von Influenza A, Influenza B und dem Influenza A Subtyp 2009 H1N1. Der Assay wird mithilfe des Cepheid GeneXpert® Dx-Systems durchgeführt.

Das GeneXpert Dx-System automatisiert und integriert die Aufreinigung der Proben, die Amplifikation der Nukleinsäuren und die Detektion der Zielsequenz in einfachen oder komplexen Proben unter Verwendung von Echtzeit-RT-PCR- und PCR-Assays. Das System besteht aus einem Instrument und einem PC mit vorinstallierter Software, die die Testläufe steuert und die Ergebnisse anzeigt. Das System arbeitet mit GeneXpert-Probenkartuschen (Einwegartikel), die die RT-PCR- und die PCR-Reagenzien enthalten und in denen das PCR-Verfahren abläuft. Da die Probenkartuschen in sich abgeschlossen sind, werden Kreuzkontaminationen zwischen einzelnen Proben minimiert. Eine vollständige Beschreibung des Dx-Systems finden Sie im *GeneXpert Dx-System Benutzerhandbuch*.

Der Xpert Flu Assay enthält Reagenzien für den Nachweis und die Differenzierung von Influenza A, Influenza B und Influenza A Subtyp 2009 H1N1 direkt aus nasalen Aspiraten/Spülungen (NA/W-Proben) und Nasopharyngealabstrichen (NP-Abstrichen) von Patienten mit Verdacht auf Influenza. Ebenso enthält die Probenkartusche eine Probenverarbeitungskontrolle (engl. SPC) sowie eine Kontrolle zur Überprüfung der Sonde (engl. PCC). Die Probenverarbeitungskontrolle SPC stellt die korrekte Verarbeitung der gesuchten Viren sicher und dient dem Nachweis von möglichen Inhibitoren in der PCR-Reaktion. Mit der Kontrolle zur Überprüfung der Sonde (engl. PCC) werden die Rehydrierung der Reagenzien, die Befüllung des PCR-Gefäßes in der Probenkartusche, die Integrität der Sonde und die Stabilität der Farbstoffe überprüft.

Reagenzien und Instrumente

Im Lieferumfang enthaltenes Material

Das Xpert Flu Assay Kit enthält ausreichend Reagenzien zur Verarbeitung von 10 Proben oder Qualitätskontroll-Proben. Inhalt des Kits:

- **Xpert Flu Assay Probenkartuschen mit integrierten Reaktionsgefäßen** — **10**
- **Kügelchen 1 (gefriergetrocknet)** — **1 pro Probenkartusche**
  - Das Enzym Reverse Transkriptase
  - Das Enzym Taq-Polymerase
  - dNTPs
  - Sonde
  - BSA (Rinderserum-Albumin)
  - Salze
- **Kügelchen 2 (gefriergetrocknet)** — **1 pro Probenkartusche**
  - Primer
  - Sonden
  - dNTPs
  - BSA (Rinderserum-Albumin)
  - Salze
- **Kügelchen 3 (gefriergetrocknet)** — **1 pro Probenkartusche**
  - Sample Processing Control, SPC (Probenverarbeitungskontrolle): nicht infektiöse Kontrolle für die Probenverarbeitung Armored RNA®
- **Lyse-Reagenz** — **2,0 mL pro Probenkartusche**
  - Guanidinhydrochlorid, Tenside
- **Wasch-Reagenz** — **0,5 mL pro Probenkartusche**
  - PEG, Monothioglycerin, KCl, Tris-Puffer, EDTA, Tenside, Natriumazid
- **Elutions-Reagenz** — **2,0 mL pro Probenkartusche**
  - Tris-EDTA Puffer, Tween 20
- **Xpert Flu Assay Reagenzien-Beutel** — **1 pro Kit**
- **Bindungs-Reagenz** — **10 x 1,0 mL pro Ampulle**
  - Wasser, Ethanol
- **300 µL-Transfer-Pipetten (Einwegartikel)** — **2 Beutel mit 12 Stück pro Kit**
- **CD** — **1 pro Kit**
  - Datei mit Assay Definition (engl. ADF)
  - Anweisungen zum Importieren der Datei mit der Assay Definition in die GX-Software
  - Packungsbeilage

Hinweis:

- Für alle Reagenzien dieses Tests sind Sicherheitsdatenblätter auf Anfrage beim Technischen Kundendienst von Cepheid oder auf der Internetseite http://www.cepheid.com/tests-and-regeants/literature/msds/ erhältlich.
- Das Rinderserum-Albumin (BSA) in diesem Produkt wurde ausschließlich aus Rinderplasma hergestellt, das aus den USA stammt. Auch die Herstellung des BSA erfolgte in den USA. Die Tiere erhielten keinerlei Wiederkäuer- oder anderes Tierprotein mit dem Futter und wurden ante- und post-mortem Tests unterzogen. Bei der Verarbeitung wurde das Material nicht mit anderen Tiermaterialien vermischt.

Lagerung und Handhabung

- Lagern Sie die Xpert Flu Assay Probenkartuschen und Reagenzien bei 2 - 28 °C.
- Öffnen Sie die Probenkartuschen erst unmittelbar vor Testdurchführung.
- Verwenden Sie keine getrübten oder verfärbten Reagenzien.
- Verwenden Sie keine Probenkartuschen mit einem Leck.

Benötigte Materialien, die nicht im Lieferumfang enthalten sind

- Das GeneXpert Dx-System (die Katalognummer hängt von der Konfiguration ab): GeneXpert-Instrument, Computer mit firmeneigener Software, Barcodescanner und Benutzerhandbuch
- Drucker (Hinweise zur Kompatibilität finden Sie im *GeneXpert Dx-System Benutzerhandbuch*)

Erhältliche Materialien, die nicht zum Lieferumfang gehören

- Nasal Collection Kit (Kit zur nasalen Probennahme), Cepheid-Katalognr. NASL-100N-100.
- Inaktivierte Virus-Kontrolle von ZeptoMetrix, Katalognr. NATFLUA/B-6MC und Katalognr. NATFLUAH1N1-MC als externe Positivkontrolle sowie Katalognr. NATCXVA9-MC (Coxsackie Virus) als externe Negativkontrolle.

Warnungen und Vorsichtshinweise

- Alle biologischen Proben und auch die gebrauchten Probenkartuschen sind als potenziell infektiös zu behandeln. Da es oft unmöglich ist zu bestimmen, welche Probe infektiös ist, sollten alle biologischen Proben mit den üblichen Vorsichtsmaßnahmen behandelt werden. Die Richtlinien zum Umgang mit Proben sind bei den U.S. Centers for Disease Control and Prevention[4,5] und dem Clinical and Laboratory Standards Institute (früher National Committee for Clinical Laboratory Standards)[6] erhältlich.
- Beachten Sie die Sicherheitsverfahren Ihrer Institution für den Umgang mit Chemikalien und die Handhabung von biologischen Proben.
- Ersetzen Sie keine Xpert Flu Assay-Reagenzien durch andere Reagenzien.
- Öffnen Sie den Deckel der Xpert Flu Assay-Probenkartusche ausschließlich für das Hinzufügen der Proben und der Reagenzien.
- Verwenden Sie keine Probenkartusche, die nach dem Befüllen mit der Probe und den Reagenzien heruntergefallen ist oder geschüttelt wurde.
- Verwenden Sie keine Probenkartusche, deren Reaktionsgefäß beschädigt ist.
- Jede Xpert Flu Assay-Probenkartusche dient zur Durchführung eines einzigen Tests (Einwegartikel). Verwenden Sie eine einmal gebrauchte Probenkartuschen nicht nochmals.
- Die ordnungsgemäße Entsorgung der gebrauchten Probenkartuschen und nicht benutzter Reagenzien besprechen Sie bitte mit dem Beauftragten für umweltgerechte Abfallentsorgung in Ihrer Einrichtung. Dieses Material kann über Eigenschaften verfügen, die gemäß gesetzlicher Richtlinien (EPA Resource Conservation and Recovery Act, RCRA) als Sondermüll definiert sind und entsprechend entsorgt werden müssen. Beachten Sie bitte die gültigen lokalen und landesweiten Vorschriften, die von bundesweiten Vorschriften zur Abfallentsorgung abweichen können. Einrichtungen außerhalb der USA sollten sich über die in ihrem Land gültigen Richtlinien zur Entsorgung von Sondermüll informieren.
- Lagern Sie das Xpert Flu Assay-Kit bei 2 - 28 °C.
- Öffnen Sie die Verpackung der Probenkartusche erst unmittelbar vor Testdurchführung.

Probennahme, Transport und Lagerung

NA/W-Proben oder NP-Abstriche können gemäß der Standardverfahren Ihrer Institution genommen und anschließend in UniversalTransportMedium (3 ml-UTM-Röhrchen) überführt werden.

Die Proben sollten bei 2 - 8 °C transportiert werden. Die Proben können vor deren Verarbeitung für bis zu 72 Stunden bei 2 - 8 °C gelagert werden.

Vorgehensweise

Vorbereiten der Probenkartusche

Wichtig: Starten Sie den Test innerhalb von 60 Minuten nach Hinzufügen der Probe und der Reagenzien zur Probenkartusche.

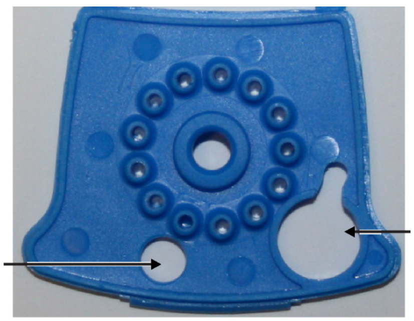
Für NP-Abstriche

1. Entnehmen Sie die Probenkartusche und die Reagenzien aus der Verpackung.
2. Durchmischen Sie die Probe durch fünfmaliges Invertieren des UTM-Röhrchens.
3. Öffnen Sie den Deckel der Probenkartusche. Überführen Sie mithilfe einer sauberen Transferpipette (im Lieferumfang enthalten) 300 µl des UTM in die Kammer „S“ der Probenkartusche.

4. Geben Sie nun Bindungs-Reagenz 1 in die Kammer 1 der Probenkartusche. Drücken Sie die Ampulle solange zusammen, bis der gesamte Inhalt in die Probenkartusche überführt ist.
5. Schließen Sie den Deckel der Probenkartusche.

Für NA/W-Proben

1. Überführen Sie mithilfe einer sauberen 300 µl-Transferpipette (im Lieferumfang enthalten) 600 µl der Probe (durch zweimaliges Pipettieren von je 300 µl) in ein 3 ml-UTM-Röhrchen und verschließen Sie anschließend das Röhrchen.
2. Mischen Sie die Probe durch fünfmaliges Invertieren des Röhrchens.
3. Entnehmen Sie die Probenkartusche und die Reagenzien aus der Verpackung.
4. Öffnen Sie den Deckel der Probenkartusche. Überführen Sie mithilfe einer sauberen 300 µl-Transferpipette (im Lieferumfang enthalten) 300 µl der verdünnten Probe in die Kammer „S“ der Probenkartusche.
5. Geben Sie nun Bindungs-Reagenz 1 in die Kammer 1 der Probenkartusche. Drücken Sie die Ampulle solange zusammen, bis der gesamte Inhalt in die Probenkartusche überführt ist.
6. Schließen Sie den Deckel der Probenkartusche.



Kammer 1 = Bindungs-Reagenz 1, Kammer „S“ = Probe

Abbildung 1. Xpert Flu Assay Probenkartusche (Draufsicht)

Test starten

Wichtig: Achten Sie vor Testbeginn darauf, dass die Datei mit der Assay Definition in der Software vorhanden ist bzw. importiert wurde. In diesem Abschnitt werden die grundlegenden Arbeitsschritte für die Durchführung des Tests mithilfe des GeneXpert Dx-Systems beschrieben. Genaue Anweisungen hierzu finden Sie im *GeneXpert Dx-System Benutzerhandbuch*.

1. Fahren Sie den Computer hoch und schalten Sie anschließend das GeneXpert Dx-Instrument ein.
2. Doppelklicken Sie auf dem Windows®-Desktop das Verknüpfungssymbol des GeneXpert Dx.
3. Melden Sie sich mit Ihrem Benutzernamen und Kennwort bei der GeneXpert Dx-Systemsoftware an.
4. Klicken Sie im Fenster des GeneXpert Dx-Systems auf **Create Test** (Test erstellen). Daraufhin wird das Dialogfeld „Scan Cartridge Barcode“ (Barcode der Probenkartusche scannen) angezeigt.
5. Scannen Sie den Barcode der Xpert Flu Assay Probenkartusche ein. Das Fenster **Create Test** (Test erstellen) wird geöffnet. Mithilfe der Barcodeinformationen gibt die Software automatisch die Daten in die folgenden Felder ein: Select Assay (Assay auswählen), Reagent Lot ID (Chargen-ID der Reagenzien) und Cartridge SN (Seriennummer der Probenkartuschen).
6. Geben Sie in dem Feld **Sample ID** die Proben-ID durch Einscannen oder manuelle Eingabe ein. Achten Sie bei der manuellen Eingabe darauf, dass Sie die Proben-ID korrekt eingeben. Die Proben-ID wird den Testergebnissen zugewiesen und wird zudem im Fenster **View Results** (Ergebnisse anzeigen) und in allen Berichten angezeigt.
7. Klicken Sie auf **Start Test** (Test starten). Geben Sie in dem daraufhin angezeigten Dialogfeld Ihr Kennwort ein.
8. Öffnen Sie die Tür des Instrumentenmoduls mit der grün blinkenden Anzeige und laden Sie die Probenkartusche in das Modul.
9. Schließen Sie die Tür. Der Test beginnt und die grüne Anzeige hört auf zu blinken. Wenn der Test abgeschlossen ist, geht die Anzeige aus.
10. Die Modultür kann erst geöffnet und die Probenkartusche entnommen werden, wenn das System die Tür entriegelt hat.
11. Die gebrauchten Kartuschen sind gemäß der Standardverfahren Ihrer Institution in entsprechenden Probenabfallbehältern zu entsorgen.

Anzeigen und Drucken der Ergebnisse

Genaue Anweisungen zum Anzeigen und Drucken der Ergebnisse finden Sie im *GeneXpert Dx-System Benutzerhandbuch*.

CONTROL

Qualitätskontrolle

Jeder Test beinhaltet eine Probenverarbeitungskontrolle (Sample Processing Control, SPC) und eine Kontrolle zur Überprüfung der Sonde (Probe Check Control, PCC).

Sample Processing Control (SPC) — (Probenverarbeitungskontrolle) Stellt sicher, dass die Probe ordnungsgemäß verarbeitet wurde. Die SPC ist eine Armored RNA® in Form eines getrockneten Kügelchens, das in jeder Probenkartusche enthalten ist. Sie dient der Sicherstellung einer korrekten Verarbeitung eines Virus in der Probe. Bei der SPC wird überprüft, ob die Lyse des Influenza-Virus durchgeführt wurde, sofern dieser vorhanden ist. Ferner wird kontrolliert, ob die Probe ordnungsgemäß verarbeitet wurde. Des Weiteren wird mit dieser Kontrolle auch eine probenassoziierte Inhibierung der RT-PCR- und PCR-Reaktionen nachgewiesen. In einer negativen Probe sollte die SPC positiv sein; in einer positiven Probe kann sie negativ oder positiv sein. Die SPC gilt als bestanden, wenn sie die validierten Akzeptanzkriterien erfüllt.

Probe Check Control (PCC) — (Kontrolle zur Überprüfung der Sonde) Vor Beginn der PCR-Reaktion misst das GeneXpert Dx-System das Fluoreszenzsignal der Sonden, um die Rehydrierung der Reagenzkügelchen, die Befüllung des Reaktionsgefäßes, die Integrität der Sonde und die Stabilität des Farbstoffs zu überwachen. Die PCC gilt als bestanden, wenn sie die validierten Akzeptanzkriterien erfüllt.

External Controls — Externe Kontrollen sollten je nach Vorgabe gemäß der Anforderungen lokaler, landes- und bundesweiter akktreditierender Organisationen verwendet werden.

Interpretation der Ergebnisse

Die Ergebnisse werden automatisch von dem GeneXpert Dx-System aus den gemessenen Fluoreszenzsignalen und den eingebetteten Berechnungsalgorithmen berechnet und im Fenster **View Results** (Ergebnisse anzeigen) angezeigt. Die folgenden Ergebnisse sind möglich:

Flu A POSITIVE; 2009 H1N1 NOT DETECTED; Flu B NEGATIVE (Abbildung 2)

Influenza A Ziel-RNA nachgewiesen; 2009 H1N1 RNA nicht nachgewiesen; Influenza B Ziel-RNA nicht nachgewiesen.

- Die Influenza A-Zielsequenz verfügt über einen Ct innerhalb des gültigen Bereichs und einen Endpunkt über der Mindesteinstellung.
- SPC — NA (keine Angaben); die SPC wird ignoriert, da die Amplifikation der Influenza A-Zielsequenz mit dieser Kontrolle kompetitieren kann.
- Probe Check – PASS (Sondentest – BESTANDEN): Alle Sondentests wurden bestanden.

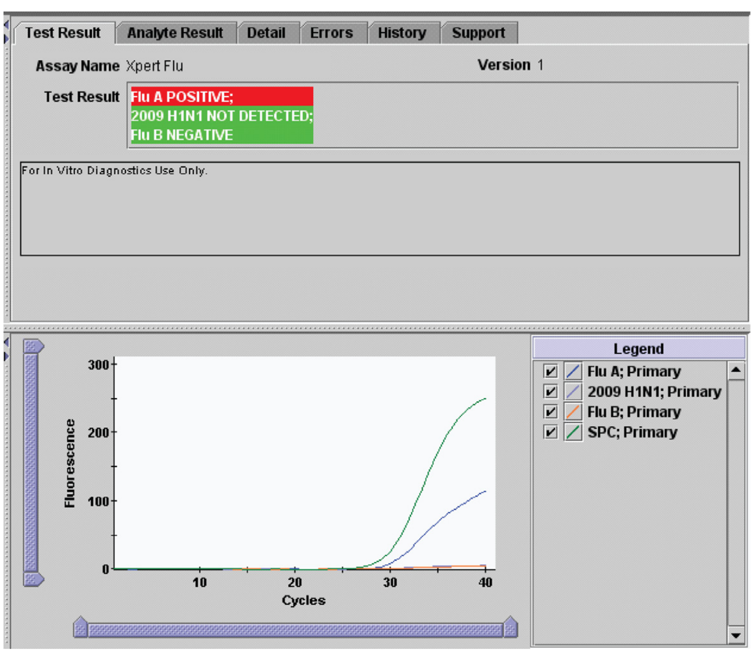


Abbildung 2. Beispiel für das Ergebnis „Influenza A-positiv“

Flu A POSITIVE; 2009 H1N1 DETECTED; Flu B NEGATIVE (Abbildung 3)

Influenza A Ziel-RNA nachgewiesen; 2009 H1N1 Ziel-RNA nachgewiesen; Influenza B Ziel-RNA nicht nachgewiesen.

- Die Influenza A-Zielsequenz verfügt über einen Ct innerhalb des gültigen Bereichs und einen Endpunkt über der Mindesteinstellung.
- Die 2009 H1N1-Zielsequenz verfügt über einen Ct innerhalb des gültigen Bereichs und einen Endpunkt über der Mindesteinstellung.
- SPC — NA (keine Angaben); die SPC wird ignoriert, da die Amplifikation der Influenza A- und 2009 H1N1-Zielsequenzen mit dieser Kontrolle kompetitieren kann.
- Probe Check – PASS (Sondentest – BESTANDEN): Alle Sondentests wurden bestanden.

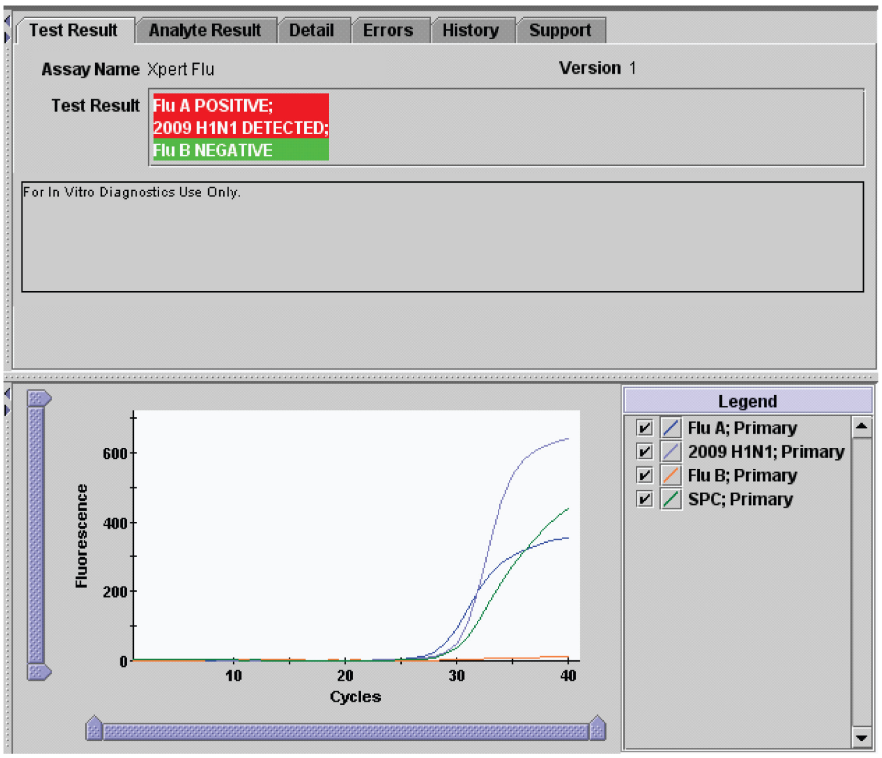


Abbildung 3. Beispiel für das Ergebnis „2009 H1N1-positiv“

Flu A NEGATIVE; 2009 H1N1 NOT DETECTED; Flu B POSITIVE (Abbildung 4)

Influenza B Ziel-RNA nachgewiesen; Influenza A Ziel-RNA nicht nachgewiesen; 2009 H1N1 Ziel-RNA nicht nachgewiesen.

- Die Influenza B-Zielsequenz verfügt über einen Ct innerhalb des gültigen Bereichs und einen Endpunkt über der Mindesteinstellung.
- SPC — NA (keine Angaben); die SPC wird ignoriert, da die Amplifikation der Influenza B-Zielsequenz mit dieser Kontrolle kompetitieren kann.
- Probe Check – PASS (Sondentest – BESTANDEN): Alle Sondentests wurden bestanden.

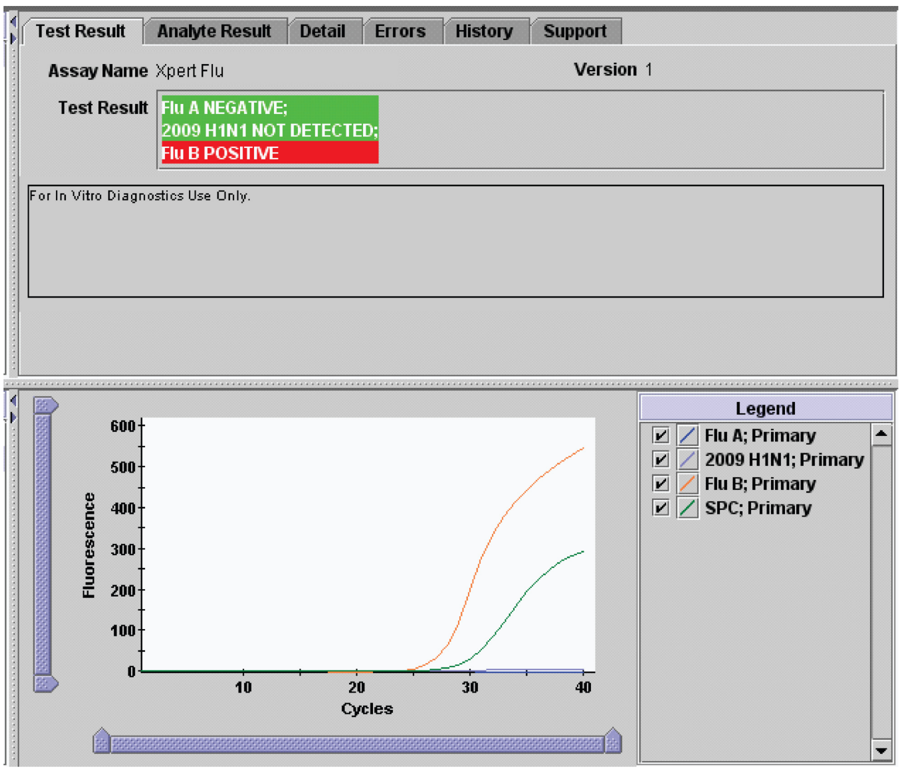


Abbildung 4. Beispiel für das Ergebnis „Influenza B-positiv“

Flu A NEGATIVE; 2009 H1N1 NOT DETECTED; Flu B NEGATIVE (Abbildung 5)

Influenza A Ziel-RNA nicht nachgewiesen; 2009 H1N1 Ziel-RNA nicht nachgewiesen und Influenza B Ziel-RNA nicht nachgewiesen. Die Probenverarbeitungskontrolle SPC erfüllt die Akzeptanzkriterien.

- Es wurden keine Ziel-RNAs für Influenza A, 2009 H1N1 und Influenza B nachgewiesen.
- SPC – PASS (SPC – BESTANDEN): Die Probenverarbeitungskontrolle SPC verfügt über einen Ct innerhalb des gültigen Bereichs und einen Endpunkt über dem Minimalgrenzwert des Endpunkts.
- Probe Check – PASS (Sondentest – BESTANDEN): Alle Sondentests wurden bestanden.

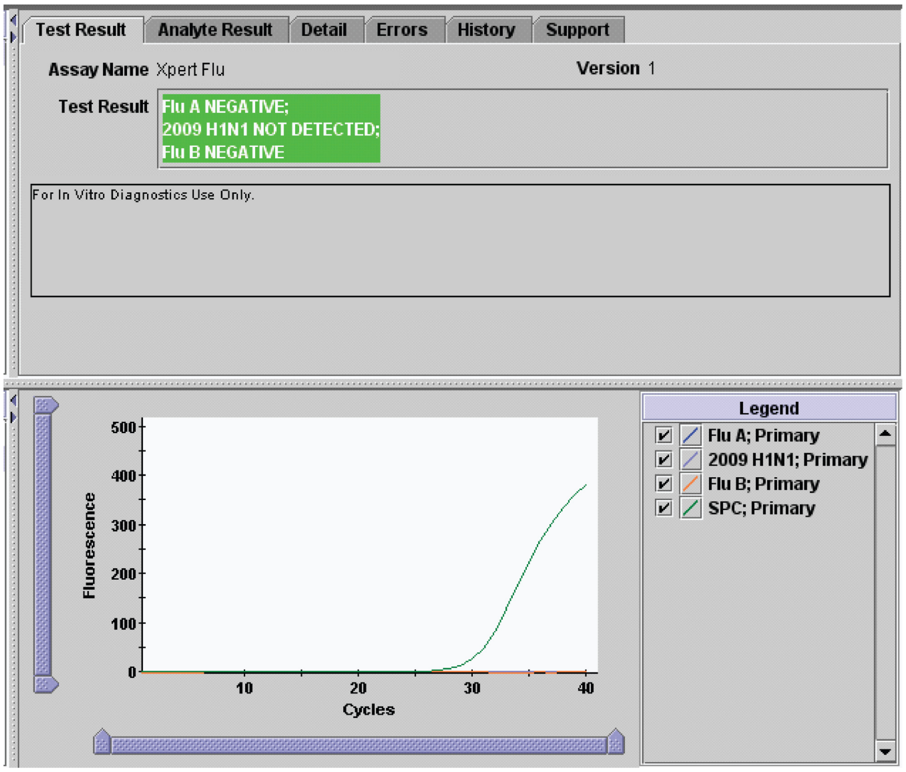


Abbildung 5. Beispiel für ein Negativergebnis

INVALID (UNGÜLTIG) (Abbildungen 6 und 7)

1. Die Probenverarbeitungskontrolle SPC erfüllt nicht die Akzeptanzkriterien. Es kann nicht ermittelt werden, ob die Ziel-RNAs vorhanden sind oder nicht. Wiederholen Sie den Test gemäß den Anweisungen im Abschnitt „Vorgehensweise für das erneute Testen" weiter unten.
   - SPC – FAIL (SPC - NICHT BESTANDEN): Die Probenverarbeitungskontrolle SPC ist negativ, der Ct der SPC liegt nicht innerhalb des gültigen Bereichs und der Endpunkt liegt unterhalb der Mindesteinstellung.
   - Probe Check – PASS (Sondentest – BESTANDEN): Alle Sondentests wurden bestanden.

   oder

2. Es kann nicht ermittelt werden, ob 2009 H1N1 Ziel-RNA vorhanden ist oder nicht. Wiederholen Sie den Test gemäß den Anweisungen im Abschnitt „Vorgehensweise für das erneute Testen" weiter unten.
   - Influenza A Ziel-RNA nicht nachgewiesen und 2009 H1N1 Ziel-RNA nachgewiesen.
   - SPC — NA (keine Angaben): Die SPC wird ignoriert, da eine Zielsequenz amplifiziert wurde.
   - Probe Check – PASS (Sondentest – BESTANDEN): Alle Sondentests wurden bestanden.

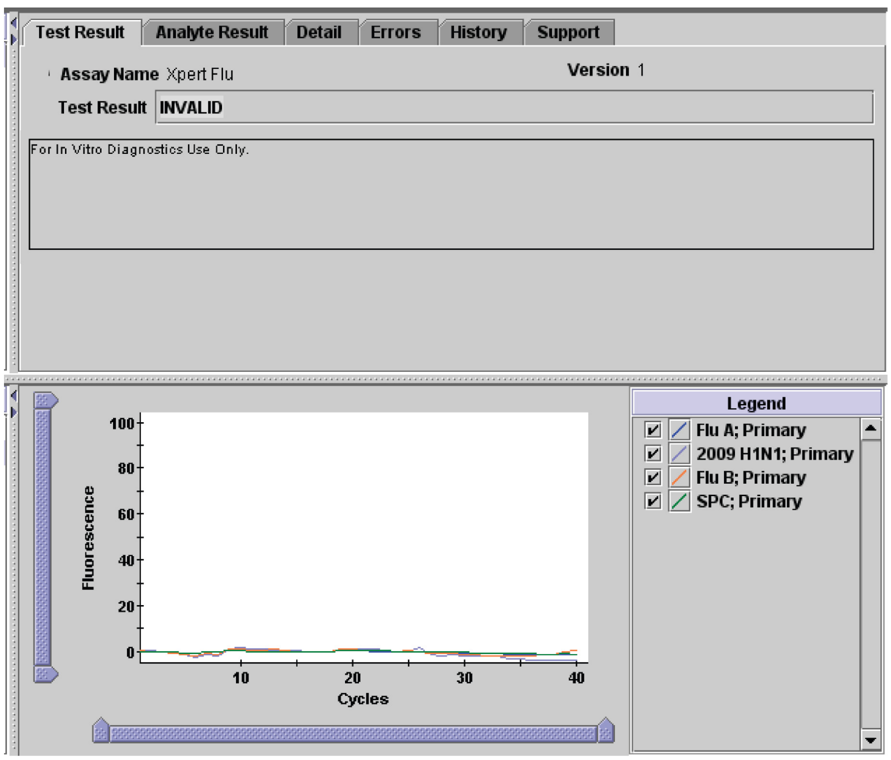


Abbildung 6. Beispiel für ein ungültiges Ergebnis (Probenverarbeitungskontrolle SPC erfüllt nicht die Akzeptanzkriterien)

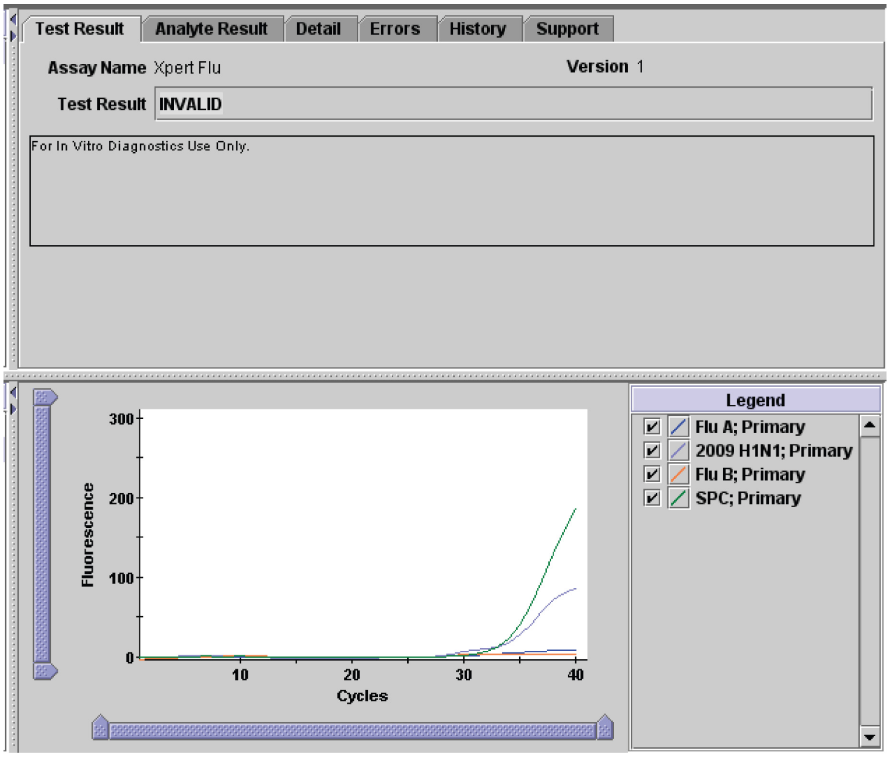


Abbildung 7. Beispiel für ein ungültiges Ergebnis (Influenza A negativ und 2009 H1N1 positiv)

ERROR (FEHLER)

Es kann nicht ermittelt werden, ob Influenza A, 2009 H1N1 und Influenza B Ziel-RNAs vorhanden sind oder nicht. Wiederholen Sie den Test gemäß den Anweisungen im Abschnitt „Vorgehensweise für das erneute Testen“ weiter unten.

- 2009 H1N1 — NO RESULT (KEIN ERGEBNIS)
- Influenza A — NO RESULT (KEIN ERGEBNIS)
- Influenza B — NO RESULT (KEIN ERGEBNIS)
- SPC — NO RESULT (KEIN ERGEBNIS)
- Probe Check – FAIL* (Sondentest – NICHT BESTANDEN*): Mindestens eine Sonde hat den Test nicht bestanden.

* Wenn der Sondentest bestanden wurde, wurde der Fehler durch Überschreiten des maximalen Druckgrenzwerts oder den Ausfall einer Systemkomponente verursacht.

NO RESULT (KEIN ERGEBNIS)

Es kann nicht ermittelt werden, ob Influenza A, 2009 H1N1 und Influenza B Ziel-RNAs vorhanden sind oder nicht. Test gemäß den Anweisungen im Abschnitt „Vorgehensweise für das erneute Testen“ weiter unten wiederholen. Das Ergebnis NO RESULT (KEIN ERGEBNIS) weist darauf hin, dass nicht genügend Daten erfasst wurden. Beispielsweise hat der Benutzer den Test abgebrochen, bevor er abgeschlossen war.

- 2009 H1N1 — NO RESULT (KEIN ERGEBNIS)
- Influenza A — NO RESULT (KEIN ERGEBNIS)
- Influenza B — NO RESULT (KEIN ERGEBNIS)
- SPC — NO RESULT (KEIN ERGEBNIS)
- Probe Check — NA (not applicable) (Sondenprüfung – nicht anwendbar)

Gründe für eine Wiederholung des Tests

Falls es zu einem der nachstehend genannten Untersuchungsergebnisse kommt, ist der Test gemäß den Anweisungen im nachfolgenden Abschnitt „Vorgehensweise für das erneute Testen“ zu wiederholen.

- Das Ergebnis INVALID (UNGÜLTIG) weist auf ein oder mehrere Dinge hin:
  - Die Probenverarbeitungskontrolle SPC schlug fehl.
  - Influenza A Ziel-RNA wird nicht nachgewiesen und 2009 H1N1 wird nachgewiesen.
  - Die Probe wurde nicht ordnungsgemäß verarbeitet oder die PCR-Reaktion wurde inhibiert.
- Das Ergebnis ERROR (FEHLER) zeigt an, dass der Assay abgebrochen wurde. Mögliche Gründe hierfür sind: Das Reaktionsgefäß wurde unsachgemäß befüllt, es wurde ein Problem mit der Integrität der Sonde festgestellt oder der Grenzwert für den Maximaldruck wurde überschritten.
- Das Ergebnis NO RESULT (KEIN ERGEBNIS) weist darauf hin, dass nicht genügend Daten erfasst wurden. Beispielsweise hat der Benutzer den Test abgebrochen, bevor er abgeschlossen war, oder es kam zu einem Stromausfall.

Vorgehensweise für das erneute Testen

Verwenden Sie für den erneuten Testlauf aufgrund eines unbestimmten Ergebnisses eine neue Probenkartusche (verwenden Sie die alte Probenkartusche nicht nochmals) und neue Reagenzien.

Verwenden Sie für NP-Abstriche 300 µl der verbliebenen Probe aus dem originalen UTM-Röhrchen.

Verwenden Sie für NA/W-Proben 300 µl der verbliebenen verdünnten Probe aus dem 3 ml-UTM-Röhrchen.

1. Entnehmen Sie eine neue Probenkartusche aus der Verpackung.
2. Mischen Sie die Probe durch fünfmaliges Invertieren des Röhrchens.
3. Öffnen Sie den Deckel der Probenkartusche. Überführen Sie mithilfe einer sauberen 300 µl-Transferpipette (im Lieferumfang enthalten) 300 µl der Probe in die Kammer „S“ der Probenkartusche.
4. Geben Sie nun Bindungs-Reagenz 1 in die Kammer 1 der Probenkartusche. Drücken Sie die Ampulle solange zusammen, bis der gesamte Inhalt in die Probenkartusche überführt ist.
5. Schließen Sie den Deckel der Probenkartusche.

Einschränkungen

- Die Leistungsfähigkeit des Xpert Flu Assays wurde ausschließlich anhand der Verfahren geprüft, die in dieser Packungsbeilage beschrieben sind. Änderungen an diesen Verfahren können die Leistungsfähigkeit des Tests beeinträchtigen.
- Ergebnisse des Xpert Flu Assays sollten unter Berücksichtigung anderer klinischer und Labordaten interpretiert werden, die dem Kliniker zur Verfügung stehen.
- Fehlerhafte Testergebnisse können auf eine unsachgemäße Probennahme, die Nichtbeachtung des empfohlenen Verfahrens zur Probennahme, die Handhabung und Lagerung, einen technischen Fehler, Probenverwechslung oder auf den Umstand zurückzuführen sein, dass die Anzahl der Organismen in der Probe zu gering ist, um durch den Test nachgewiesen werden zu können. Zur Vermeidung fehlerhafter Ergebnisse sind die Anweisungen in dieser Beilage genauesten zu befolgen.
- Proben, die durch Zugabe von 1,5% (w/v) und 2,5 % (w/v) Muzin stark viskös wurden, lieferten mit dem Xpert Flu Assay falsch-negative Testergebnisse. Ebenso wird der Xpert Flu Assay durch die Zugabe von 1% (w/v) Muzin inhibiert, die zu einer verzögerten Detektion von Influenza A, Influenza A Subtyp 2009 H1N1 und Influenza B führt.

Merkmale der Leistungsfähigkeit

Klinische Leistungsfähigkeit

Die Merkmale der Leistungsfähigkeit des Xpert Flu Assays wurden in zwei US-amerikanischen Institutionen begutachtet.

Zu dem Patientenkreis gehörten Personen, deren Routineversorgung, eine NA/W-Probennahme oder ein NP-Abstrich für einen Test auf Influenza beinhaltete. Von den für die Untersuchung zugelassenen Patienten wurden Aliquots von verbliebenen Proben für den Test mit dem Xpert Flu Assay und einem Referenztestverfahren erhalten.

Für Proben, die vor dem Einfrieren kultiviert worden waren, wurde die Leistungsfähigkeit des Xpert Flu Assays relativ zu den Referenzergebnissen berechnet (d.h. virale Kultur gefolgt von einem direkten Fluoreszenz-Assay (DFA) einschließlich einer Bestätigung aller Influenza A-positiver Proben durch Sequenzierung). Für Proben, die vor dem Einfrieren nicht kultiviert worden waren, wurde die Leistungsfähigkeit des Xpert Flu Assays in Relation zu dem Prodesse ProFlu+™ Assay und Sequenzierungen bestimmt. Alle Influenza A-positiven Proben, die durch virale Kultur oder den ProFlu+ Assay identifiziert worden sind, wurden anschließend zur Differenzierung von Influenza A und 2009 H1N1 von anderen Influenza A Subtypen sequenziert.

Gesamtergebnisse

Insgesamt wurden 270 archivierte NP-Abstriche auf Influenza A, Influenza A Subtyp 2009 H1N1 und Influenza B mithilfe des Xpert Flu Assays und viraler Kultur getestet. Insgesamt wurden 357 archivierte NA/W-Proben auf Influenza A, Influenza A Subtyp 2009 H1N1 und Influenza B mithilfe des Xpert Flu Assays und dem ProFlu+ Assay getestet. Alle Influenza A-positiven Proben, die durch virale Kultur oder den ProFlu+ Assay identifiziert worden sind, wurden sequenziert, um Influenza A und 2009 H1N1 von anderen Influenza A Subtypen zu unterscheiden.

Die Sensitivität und Spezifität des Xpert Flu Assays für Influenza A aus NP-Abstrichen lag, in Relation zur viralen Kultur und DFA und einer Bestätigung aller Influenza A-positiver Isolate durch Sequenzierung, bei 97,5% bzw. 100% (Tabelle 1). Die Sensitivität und Spezifität des Xpert Flu Assays für den Influenza A Subtyp 2009 H1N1 in NP-Abstrichen lag bei 100 % bzw. 100 % (Tabelle 2). Die Sensitivität und Spezifität des Xpert Flu Assays für Influenza B in NP-Abstrichen lag bei 93,8 % bzw. 99,6 % (Tabelle 3).

Tabelle 1. Leistungsfähigkeit des Xpert Flu Assays im Vergleich zur Referenzmethode für NP-Abstriche — Influenza A

		Virale Kultur + DFA		
		Pos	**Neg**	**Insgesamt**
Xpert Flu Assay	**Pos**	115	0	115
	Neg	3	152	155
	Insgesamt	118	152	270
		Sensitivität:	97,5% (95% CI: 92,8-99,5)	
		Spezifität:	100% (95% CI: 97,6-100)	
		Genauigkeit:	98,9% (95% CI: 96,8-99,8)	
		PPV:	100% (95% CI: 96,8-100)	
		NPV:	98,1% (95% CI: 94,5-99,6)	

Tabelle 2. Leistungsfähigkeit des Xpert Flu Assays im Vergleich zur Referenzmethode für NP-Abstriche — 2009 H1N1

		Virale Kultur + DFA/Sequenzierung		
		Pos	**Neg**	**Insgesamt**
Xpert Flu Assay	**Pos**	85	0	85
	Neg	0	182	182
	Insgesamt	85	182	267
		Sensitivität:	100% (95% CI: 95,6-100)	
		Spezifität:	100% (95% CI: 98,0-100)	
		Genauigkeit:	100% (95% CI: 98,6-100)	
		PPV:	100% (95% CI: 95,6-100)	
		NPV:	100% (95% CI: 98,0-100)	

Tabelle 3. Leistungsfähigkeit des Xpert Flu Assays im Vergleich zur Referenzmethode für NP-Abstriche — Influenza B

Xpert Flu Assay	Virale Kultur + DFA			
		Pos	**Neg**	**Insgesamt**
	Pos	30	1	31
	Neg	2	237	239
	Insgesamt	32	238	270
		Sensitivität:	93,8% (95% CI: 79,2-99,2)	
		Spezifität:	99,6% (95% CI: 97,7-100)	
		Genauigkeit:	98,9% (95% CI: 96,8-99,8)	
		PPV:	96,8% (95% CI: 83,3-99,9)	
		NPV:	99,2% (95% CI: 97,0-99,9)	

In Relation zu dem ProFlu+ Assay und der Bestätigung aller Influenza A-positiver Isolate durch Sequenzierung identifizierte der Xpert Flu Assay 99,2 % der NA/W-Proben, die Influenza A-positiv waren, und 100 % aller Proben, die Influenza A-negativ waren (Tabelle 4). Der Xpert Flu Assay identifizierte 97,9 % aller NA/W-Proben, die positiv für den Influenza A Subtyp 2009 H1N1 waren, sowie 100 % aller Proben, die negativ für den Influenza A Subtyp 2009 H1N1 waren (Tabelle 5). Ferner identifizierte der Xpert Flu Assay 100 % aller NA/W-Proben, die positiv für Influenza B waren, sowie 100% aller Proben, die negativ für Influenza B waren (Tabelle 6).

Tabelle 4. Leistungsfähigkeit des Xpert Flu Assays im Vergleich zur Referenzmethode für NA/W-Proben — Influenza A

Xpert Flu Assay	ProFlu+			
		Pos	**Neg**	**Insgesamt**
	Pos	125	0	125
	Neg	1	231	232
	Insgesamt	126	231	357
		Sensitivität:	99,2% (95% CI: 95,7-100)	
		Spezifität:	100% (95% CI: 98,4-100)	
		Genauigkeit:	99,7% (95% CI: 98,5-100)	
		PPV:	100% (95% CI: 97,1-100)	
		NPV:	99,6% (95% CI: 97,6-100)	

Tabelle 5. Leistungsfähigkeit des Xpert Flu Assays im Vergleich zur Referenzmethode für NP-Abstriche — 2009 H1N1

Xpert Flu Assay	ProFlu+/Sequenzierung		
	Pos	Neg	Insgesamt
Pos	94	0	94
Neg	2	261	263
Insgesamt	96	261	357

Sensitivität:	97,9% (95% CI: 92,7-99,8)
Spezifität:	100% (95% CI: 98,6-100)
Genauigkeit:	99,4% (95% CI: 98,0-99,9)
PPV:	100% (95% CI: 96,1-100)
NPV:	99,2% (95% CI: 98,6-100)

Tabelle 6. Leistungsfähigkeit des Xpert Flu Assays im Vergleich zur Referenzmethode für NA/W-Proben — Influenza B

Xpert Flu Assay	ProFlu+		
	Pos	Neg	Insgesamt
Pos	40	0	40
Neg	0	317	317
Insgesamt	40	317	357

Sensitivität:	100% (95% CI: 91,2-100)
Spezifität:	100% (95% CI: 98,8-100)
Genauigkeit:	100% (95% CI: 99,0-100)
PPV:	100% (95% CI: 91,2-100)
NPV:	100% (95% CI: 98,8-100)

Von den Xpert Flu Assay Testläufen mit zugelassenen NP-Abstrichen lieferten 98,9 % (267/270) beim ersten Testlauf ein gültiges Ergebnis. Drei Proben lieferten beim ersten Testlauf ein unbestimmtes Ergebnis (1 „INVALID“ (UNGÜLTIG) und 2 „ERROR“ (FEHLER)). Alle 3 Proben erzielten im zweiten Testlauf ein gültiges Ergebnis. Von den Xpert Flu Assay Testläufen mit zugelassenen NA/W-Proben ergaben 95,5 % (342/358) beim ersten Testlauf ein gültiges Ergebnis. Die übrigen 16 Proben ergaben beim ersten Testlauf ein unbestimmtes Ergebnis (4 „INVALID“ (UNGÜLTIG), 11 „ERROR“ (FEHLER) und 1 „NO RESULT“ (KEIN ERGEBNIS)). Fünfzehn der 16 Proben erzielten im zweiten Testlauf ein gültiges Ergebnis.

Analytische Leistungsfähigkeit

Analytische Sensitivität (Nachweisgrenze)

Für folgende Virusstämme wurden Untersuchungen zur Bestimmung des 95 %-Konfidenzintervalls für die analytische Nachweisgrenze (engl. LoD) durchgeführt: 2 saisonale Influenza A-Stämme (H1N1), 2 saisonale Influenza A-Stämme (H3N2), 5 Influenza A 2009 H1N1-Stämme und 2 Influenza B-Stämme. Hierzu wurden die viralen Stämme in einer NP-Ersatzmatrix verdünnt. Die Ersatzmatrix bestand aus 1% Humanblut, 2,5% Muzin und 0,85% Natriumchlorid. Die Nachweisgrenze ist definiert als die niedrigste Konzentration (Infektiöse Dosis in der Gewebekultur (engl. $TCID_{50}$/mL) pro Probe, die mit einer Zuverlässigkeit von 95 % reproduzierbar von negativen Proben unterschieden werden kann, oder als die niedrigste Konzentration, bei der 19 von 20 Replikaten positiv getestet wurden. Für jeden Stamm wurden pro Virus-Konzentration jeweils 20 Replikate getestet.

Die Abschätzung und die Konfidenzintervalle wurden mithilfe der logistischen Regression anhand von Daten (Anzahl der positiven Ergebnisse pro Anzahl der Replikate für jede Konzentration) über den getesteten Konzentrationsbereich ermittelt. Die Konfidenzintervalle wurden mithilfe der Maximun-Likelihood-Abschätzung der logistischen Modellparameter unter Verwendung der Varianz-Kovarianz-Matrix ermittelt. Die Abschätzungen der Nachweisgrenze und die oberen und unteren 95-%-Konfidenzintervalle für jeden getesteten Stamm sind in den Tabellen Tabellen 7 und 10 aufgeführt.

Tabelle 7. 95-%-Konfidenzintervalle für die analytische Nachweisgrenze – Saisonale Influenza A H1N1

Stamm ID-Influenza A H1N1	Unteres 95-%-CI	Nachweisgrenze (LoD) ($TCID_{50}$/mL)	Oberes 95-%-CI
Influenza A/H1/Brisbane/59/07	1,0	1,3	1,9
Influenza A/H1/New Calendonia/20/1999	5,9	7,3	11,7

Tabelle 8. 95-%-Konfidenzintervalle für die analytische Nachweisgrenze (LoD) – Saisonale Influenza A H3N2

Stamm ID-Influenza A H3N2	Unteres 95-%-CI	Nachweisgrenze (LoD) ($TCID_{50}$/mL)	Oberes 95-%-CI
Influenza A/H3/Brisbane/10/07	2,1	2,5	3,3
Influenza A/H3/Wisconsin/67/05	5,0	5,9	7,9

Tabelle 9. 95-%-Konfidenzintervalle für die analytische Nachweisgrenze (LoD) – Influenza A 2009 H1N1

Stamm ID-2009 H1N1	Unteres 95-%-CI	Nachweisgrenze (LoD) ($TCID_{50}$/mL)	Oberes 95-%-CI
Influenza A/SwineNY/01/2009	1,1	1,4	2,1
Influenza A/SwineNY/02/2009	4,0	4,8	7,3
Influenza A/SwineNY/03/2009	3,3	3,5	4,1
Influenza A/Canada/6294	66,3	77,1	105,4
Influenza A/WI/629-S1/2009	15,0	16,2	19,1

Tabelle 10. 95-%-Konfidenzintervalle für die analytische Nachweisgrenze (LoD) – Influenza B

Stamm ID-Influenza A H1N1	Unteres 95-%-CI	Nachweisgrenze (LoD) ($TCID_{50}$/mL)	Oberes 95-%-CI
Influenza B/Florida/02/06	1,2	1,5	2,2
Influenza B/Florida/07/04	41,3	50,6	72,9

Analytische Spezifität (Kreuzreaktivität)

Die analytische Spezifität des Xpert Flu Assays wurde anhand von Testläufen mit 40 Kulturen von 18 viralen und 21 bakteriellen Stämme sowie 1 Hefe-Stamm bestimmt. Die getesteten Kulturen repräsentieren häufige Pathogene der Atemwege oder Organismen, die potentiell im Nasopharynx anzutreffen sind. Alle bakteriellen Stämme und der Hefe-Stamm wurden in 3 Replikaten in einer Konzentration von $\geq 10^6$ CFU/mL getestet. Alle viralen Stämme wurden in 3 Replikaten in einer Konzentration von $\geq 10^4$ $TCID_{50}$/mL getestet. Es wurden positive und negative Kontrollen in die Studie einbezogen. Die analytische Spezifität betrug 100 %. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 11 aufgeführt.

Tabelle 11. Analytische Spezifität des Xpert Flu Assays

Stamm	Konzentration (pro Probenkartusche)	Influenza A	Influenza A 2009 H1N1	Influenza B
Positivkontrolle 1 – Influenza A/Influenza B	kA	+	-	+
Positivkontrolle 2 – Influenza A 2009 H1N1	kA	+	+	-
Negativkontrolle	kA	-	-	-
Adenovirus Typ 7A	1×10^6 $TCID_{50}$/mL	-	-	-
Adenovirus Typ 1	1×10^6 $TCID_{50}$/mL	-	-	-
Humanes Coronavirus 229E	1×10^6 $TCID_{50}$/mL	-	-	-
Humanes Coronavirus OC43	1×10^4 $TCID_{50}$/mL	-	-	-
Cytomegalovirus*	1×10^5 Kopien/mL	-	-	-
Enterovirus Typ 71	1×10^6 $TCID_{50}$/mL	-	-	-
Epstein-Barr Virus	1×10^5 $TCID_{50}$/mL	-	-	-
Parainfluenzavirus Typ 1	1×10^5 $TCID_{50}$/mL	-	-	-
Parainfluenzavirus Typ 2	1×10^6 $TCID_{50}$/mL	-	-	-
Parainfluenzavirus Typ 3	1×10^6 $TCID_{50}$/mL	-	-	-
Masernvirus	1×10^6 $TCID_{50}$/mL	-	-	-
Humanes Metapneumovirus	1×10^6 $TCID_{50}$/mL	-	-	-
Mumpsvirus	1×10^6 $TCID_{50}$/mL	-	-	-
Respiratory-Syncytial-Virus A	1×10^6 $TCID_{50}$/mL	-	-	-
Respiratory-Syncytial-Virus B	1×10^6 $TCID_{50}$/mL	-	-	-
Humanes HSV Typ 1	1×10^6 $TCID_{50}$/mL	-	-	-
Humanes Rhinovirus Typ 4	1×10^6 $TCID_{50}$/mL	-	-	-
Echovirus 11	1×10^6 $TCID_{50}$/mL	-	-	-
*Bordetella pertussis**	1×10^6 Kopien/mL	-	-	-
Chlamydia pneumoniae	1×10^6 CFU/mL	-	-	-
Corynebacterium xerosis	1×10^6 CFU/mL	-	-	-
Escherichia coli	1×10^6 CFU/mL	-	-	-
Proteus vulgaris	1×10^6 CFU/mL	-	-	-
Proteus mirabilis	1×10^6 CFU/mL	-	-	-
Klebsiella pneumoniae	1×10^6 CFU/mL	-	-	-
Haemophilus influenzae	1×10^6 Kopien/mL	-	-	-
Lactobacillus crispatus	1×10^6 CFU/mL	-	-	-
Legionella pneumophila	1×10^6 CFU/mL	-	-	-
Moraxella catarrhalis	1×10^6 CFU/mL	-	-	-
Mycobacterium tuberculosis (BCG Stamm)	1×10^6 CFU/mL	-	-	-
Mycoplasma pneumoniae	1×10^6 CFU/mL	-	-	-
Neisseria meningitides	1×10^6 CFU/mL	-	-	-
Neisseria cinneria	1×10^6 CFU/mL	-	-	-
Pseudomonas aeruginosa	1×10^6 CFU/mL	-	-	-
Staphylococcus aureus	1×10^6 CFU/mL	-	-	-
Staphylococcus epidermidis	1×10^6 CFU/mL	-	-	-
Streptococcus pneumoniae	1×10^6 CFU/mL	-	-	-
Streptococcus pyogenes	1×10^6 CFU/mL	-	-	-
Streptococcus salivarius	1×10^6 CFU/mL	-	-	-
Candida albicans	1×10^6 CFU/mL	-	-	-

* Nukleinsäure wurde auf Cytomegalovirus und Bordetalla pertussis getestet.

Analytische Reaktivität (Inklusivität)

Die analytische Reaktivität des Xpert Flu Assay wurde gegen eine Reihe von Influenza-Stämmen getestet: Influenza A (H1N1, H3N2, H5N2, H5N1 und H7N3 Subtypen), Influenza A 2009 H1N1 und Influenza B. Von diesen Stämmen wurden folgende Stämme in die Untersuchung eingeschlossen: Influenza A Subtyp H1N1 (12), Influenza A Subtyp H3N2 (7), Influenza A Subtyp 2009 H1N1 (6), Influenza A Subtyp H5N1 (1), Influenza A Subtyp H5N2 (1), Influenza A Subtyp H7N3 (1) sowie Influenza B (11). Drei Replikate jedes einzelnen Virusstamms wurden zwischen 5 – 500 $TCID_{50}$/mL getestet. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 12 aufgeführt.

Tabelle 12. Analytische Reaktivität (Inklusivität) des Xpert Flu Assays

Virusstamm	Konzentration ($TCID_{50}$/mL)	Influenza A	Influenza A 2009 H1N1	Influenza B
Influenza A/Denver/1/57 (H1N1)	500	+	-	-
Influenza A/NewYork/55/2004 (H1N1)	500	+	-	-
Influenza A/Mal/302/54 (H1N1)	50	+	-	-
Influenza A/New Jersey/8/76 (H1N1)	500	+	-	-
Influenza A/NWS/33 (H1N1)	5	+	-	-
Influenza A/PR/8/34 (H1N1)	500	+	-	-
Influenza A/Taiwan/42/06 (H1N1)	500	+	-	-
Influenza A/WS/33 (H1N1)	5	+	-	-
Influenza A/Swine/1976/31 (Swine H1N1)	500*	+	-	-
Influenza A/Swine/Iowa/15/30 (Swine H1N1)	500*	+	-	-
Influenza A/Brisbane/59/07 (H1N1)	5	+	-	-
Influenza A/NewCalendonia/20/1999 (H1N1)	50	+	-	-
Influenza A/Victoria/3/75 (H3N2)	500	+	-	-
Influenza A/Aichi2/68 (H3N2)	500	+	-	-
Influenza A/Hong Kong/8/68 (H3N2)	50	+	-	-
Influenza A/Hawaii/15/2001 (H3N2)	500	+	-	-
Influenza A/Port Chalmers/1/73 (H3N2)	500	+	-	-
Influenza A/Brisbane/10/07 (H3N2)	10	+	-	-
Influenza A/Wisconsin/67/05 (H3N2)	10	+	-	-
Influenza A/SwineNY/01/2009 (09 H1N1)	10	+	+	-
Influenza A/SwineNY/02/2009 (09 H1N1)	100	+	+	-
Influenza A/SwineNY/03/2009 (09 H1N1)	10	+	+	-
Influenza A/California/4/2009 (09 H1N1)	5	+	+	-
Influenza A/Canada/6294 (09 H1N1)	500	+	+	-
Influenza A/WI/929-S1 (09 H1N1)	100	+	+	-
Influenza A/Mallard/WI/34/75 (H5N2)	3 pg/µL^^	+	-	-
Influenza A/Anhui/02/2005/PR8-IBCDC-RG5 (H5N1)	0,122 pg/µL^^	+	-	-
Influenza A/chicken/NJ/15086-3/94 (H7N3)	5 pg/µL^^	+	-	-
Influenza B/Allen/45	500	-	-	+
Influenza B/Florida/02/06	10	-	-	+
Influenza B/Florida/04/06	500	-	-	+
Influenza B/Florida/07/04	50	-	-	+
Influenza B/GL/1739/54	500	-	-	+
Influenza B/Hong Kong/5/72	500	-	-	+
Influenza B/Lee/40	500	-	-	+
Influenza B/Malaysia/2506/04	500	-	-	+
Influenza B/Maryland/1/59	500	-	-	+
Influenza B/Panama/45/90	500	-	-	+
Influenza B/Taiwan/2/62	50^	-	-	+

* Konzentration angegeben in PFU/mL; ^Konzentration angegeben in CEID50/mL (CEID = Hühnerembryo-Infektiöse Dosis); ^^Konzentration angegeben in Pikogramm/µL

Studie zu interferierenden Substanzen

In einer nicht-klinischen Studie wurde der mögliche Einfluss potenzieller interferierender Substanzen, die im Nasopharynx vorhanden sein können, auf die Leistungsfähigkeit des Xpert Flu Assays untersucht. Zu den potentiell interferierenden exogenen Substanzen im Nasopharynx gehören unter anderem: Blut, nasale Sekrete oder Mukus sowie Medikamente für Hals und Nase, die für die Behandlung von Verstopfung, nasaler Trockenheit, Reizung oder Asthma und allergischen Symptomen verwendet werden. Diese Substanzen sind mit ihren aktiven Bestandteilen und getesteten Konzentrationen in Tabelle 13 aufgeführt. Proben, die durch Zugabe von 1,5% (w/v) und 2,5 % (w/v) Muzin stark viskös wurden, lieferten mit dem Xpert Flu Assay falsch-negative Testergebnisse. Ebenso wird der Xpert Flu Assay durch die Zugabe von 1% (w/v) Muzin inhibiert, die zu einer verzögerten Detektion von Influenza A, Influenza A Subtyp 2009 H1N1 und Influenza B führt.

Tabelle 13. Potentiell interferierende Substanzen im Xpert Flu Assay

Substanz	Beschreibung/Aktiver Bestandteil	Getestete Konzentrationen
Blut (human)	kA	2% (v/v)
Muzin	Gereinigtes Muzin (Bovine oder porcine Unterkieferspeicheldrüse)	2,5%, 1,5%, 1%, und 0,5% (w/v)
Neo-Synephrine®Nasentropfen	Phenylephrinhydrochlorid	15% (v/v)
Anefrin Nasenspray	Oxymetazolinhydrochlorid	15% (v/v)
Zicam® Nasengel	Luffa opperculata, Galphimia glauca, Histaminum hydrochloricum, Schwefel	5% (v/v)
Salines Nasenspray	Natriumchlorid mit Konservierungsstoffen	15% (v/v)
Antibiotikum, Nasensalbe	Mupirocin	10 mg/mL
Antibakteriell, systemisch	Tobramycin	4,0 µg/mL
Halstabletten, orales Anästhetikum und Analgetikum	Menthol	1,7 mg/mL Menthol

Studie zur Kontaminationsübertragung

Mithilfe einer Studie sollte gezeigt werden, dass die in sich abgeschlossenen Einweg-Probenkartuschen eine Kontamination von negativen Proben, die direkt nach stark positiven Proben in demselben GeneXpert Modul verarbeitet werden, verhindern. Hierfür wurde eine negative Probe direkt nach einer Probe mit einer sehr hohen Konzentration des Influenza A Subtyps 2009 H1N1 (etwa 10^6 $TCID_{50}$/Test) oder des Influenza B Virus (etwa 10^6 $TCID_{50}$/Test) in dem gleichen GeneXpert Modul verarbeitet wurde. Dieses Test-Schema wurde 20 mal mit 4 GeneXpert Modulen wiederholt. Die insgesamt 88 Testläufe lieferten 40 positive und 48 negative Proben. Alle 40 positiven Proben wurden korrekt als Influenza A 2009 H1N1-positiv oder Influenza B-positiv erkannt. Alle 48 negativen Proben wurden korrekt als Influenza A-negativ, 2009 H1N1-nicht detektiert und Influenza B-negativ erkannt.

Reproduzierbarkeit

Eine Reihe von 10 Proben mit unterschiedlichen Konzentrationen von Influenza A, Influenza B und Influenza A Subtyp H1N1 wurden im Duplikat an 10 verschiedenen Tagen in jeder der drei Einrichtungen getestet (10 Proben × 2 mal/Tag × 10 Tage × 3 Einrichtungen). In jeder der drei Einrichtungen kam die gleiche Charge des Xpert Flu Assays zur Anwendung. Die Xpert Flu Assays wurden entsprechend dem Xpert Flu Assay-Verfahren durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Studie sind in Tabelle 14 zusammengefasst.

Tabelle 14. Zusammenfassung der Ergebnisse zur Reproduzierbarkeit[a]

Proben-ID	Einrichtung 1	Einrichtung 2	Einrichtung 4	Prozentuale Gesamtübereinstimmung (Proben)
Negativ	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (60/60)
Influenza A mäßig positiv	100% (20/20)	100% (19/19)[b]	100% (20/20)	100% (59/59)
Influenza A schwach positiv	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (60/60)
Influenza A stark negativ	100% (20/20)	95,0% (19/20)	90% (18/20)	95,0% (57/60)
2009 H1N1 mäßig positiv	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (60/60)
2009 H1N1 schwach positiv	100% (20/20)	100% (19/19)[a]	100% (20/20)	100% (59/59)
2009 H1N1 stark negativ	94,7% (18/19)[b]	100% (20/20)	89,5% (17/19)[b]	94,8% (55/58)[c]
Influenza B mäßig positiv	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (60/60)
Influenza B schwach positiv	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (60/60)
Influenza B stark negativ	90,0% (18/20)	95,0% (19/20)	55,0% (11/20)	80,0% (48/60)
Prozentuale Gesamtübereinstimmung	98,5% (196/199)	99,0% (196/198)	93,5% (186/199)	97,0% (578/596)

[a] n=19 da eine (1) Probe ein unbestimmtes Ergebnis lieferte und nicht erneut getestet wurde.
[b] n=19 da das erneute Testen ein unbestimmtes Ergebnis lieferte.
[c] 9/55 Proben negativ für 2009 H1N1 wurde als gültiges Influenza A-positiv Ergebnis bewertet, da ein Influenza A Signal detektiert wurde. Ein 2009H1N1-Ergebnis ist dann gültig, wenn sowohl das Influenza A- als auch das 2009 H1N1-Signal nachgewiesen werden.

Referenzen

1. Petric M, Comanor L, Petti CA. Role of the laboratory in diagnosis of influenza during seasonal epidemics and potential pandemics. J Infect Dis. 2006;194:S98-110.

2. Schweiger B, Zadow I, Heckler R, et al. Application of a fluorogenic PCR assay for typing and subtyping of influenza viruses in respiratory samples. J Clin Micro. 2000;38:1552-1558.

3. http://www.cdc.gov - Abgerufen am 22. Februar 2010.

4. Centers for Disease Control and Prevention. Biosafety in microbiological and biomedical laboratories. Richmond JY und McKinney RW (eds) (1993). HHS Publikationsnummer (CDC) 93-8395.

5. Interim Biosafety Guidance for All Individuals Handling Clinical Specimens or Isolates Containing 2009-H1N1 Influenza A Virus (Novel H1N1), including Vaccine Strains, August 15, 2009; (http://www.cdc.gov/h1n1flu/guidelines_labworkers.htm).

6. Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly National Committee for Clinical Laboratory Standards). Protection of laboratory workers from occupationally acquired infections; Approved Guideline. Document M29 (siehe letzte Ausgabe).

Hilfestellung

Für Hilfestellung können Sie Cepheid wie folgt kontaktieren. Geben Sie bei Ihrem Anruf bzw. in Ihrer E-Mail auf jeden Fall die Seriennummer des Instruments und die Chargen-ID des Reagenz an.

Nordamerika

Unseren technischen Kundendienst erreichen Sie unter:

Tel: +1.888.838.3222

E-Mail: techsupport@cepheid.com

Sie können den technischen Kundendienst von Cepheid montags bis freitags von 5:00 bis 17:00 Uhr pazifischer Zeit erreichen.

Europäische Union

Unseren technischen Kundendienst erreichen Sie unter:

Tel: +33.563.82.53.19

Fax: +33.563.82.53.01

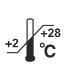
E-Mail: techsupport@cepheid.fr

Andere Standorte

Wenden Sie sich an Ihre lokale Cepheid-Niederlassung.

Tabelle mit Symbolen

Tabelle 15. Bedeutung der Symbole

Symbol	Bedeutung
REF	Katalog-Nr.
IVD	*Medizinisches Gerät für die In-vitro*-Diagnostik
	Nicht wiederverwenden
	Hersteller
	Lieferumfang reicht für <n> Tests
CONTROL	Kontrolle
EC REP	Autorisierte Vertretung in der Europäischen Gemeinschaft
 +2 +28 °C	Temperaturbegrenzung
	Biologische Gefahr

Hersteller

Cepheid
904 Caribbean Drive
Sunnyvale, CA 94089-1189, USA

Telefon: +1.408.541.4191
Fax: +1.408.541.4192

EC REP Autorisierte Vertretung

Cepheid Europa
Vira-Solelh
81470 Maurens-Scopont
Frankreich

Tel: +33.563.82.53.00
Fax: +33.563.82.53.01
E-Mail: cepheid@cepheideurope.fr

CE IVD

Español

Para uso diagnóstico *in vitro* exclusivamente

Denominación común

Xpert® Flu

Nombre común o de uso frecuente

Ensayo Xpert Flu

Uso previsto

El ensayo Cepheid® Xpert Flu es un ensayo de RT-PCR en tiempo real múltiple automatizado indicado para la detección y diferenciación cualitativas *in vitro* de la Influenza A, la Influenza B y el ARN vírico de la influenza H1N1 de 2009. El ensayo Xpert Flu utiliza muestras procedentes de aspiraciones/lavados nasales y muestras nasofaríngeas mediante hisopo de pacientes con signos y síntomas de infección respiratoria en combinación con factores de riesgo clínicos y epidemiológicos. El ensayo Xpert Flu está diseñado como ayuda para el diagnóstico de la influenza.

Resumen y explicación

La influenza o gripe es una infección vírica contagiosa del tracto respiratorio que suele presentarse en invierno. La transmisión de la influenza se produce principalmente por el aire (es decir, mediante la tos o los estornudos). Los síntomas más comunes son fiebre, escalofríos, dolor de cabeza, malestar general, tos y congestión nasal. También pueden aparecer síntomas gastrointestinales (es decir, náuseas, vómitos o diarrea), especialmente en los niños, aunque no son tan comunes. Los síntomas suelen aparecer en el plazo de dos días desde la exposición a un individuo infectado. Es posible que la infección de la influenza se complique hasta derivar en neumonía, provocando una mayor morbilidad y mortalidad en niños, ancianos y personas inmunodeprimidas.[1,2]

Los virus de la influenza se clasifican en tipos A, B y C, siendo los dos primeros los que provocan un mayor número de infecciones en humanos. La Influenza A es el tipo más habitual de virus de influenza en humanos y suele ser responsable de las epidemias de gripe estacional, pudiendo llegar a causar pandemias. Los virus de la Influenza A también pueden infectar a algunos animales, como las aves, los cerdos y los caballos. Las infecciones provocadas por los virus de la Influenza B suelen estar restringidas a los humanos y es menos común que causen epidemias. Los virus de la Influenza A se dividen en varios subtipos atendiendo a dos proteínas superficiales: la hemaglutinina (H) y la neuraminidasa (N). La gripe estacional suele estar provocada por combinaciones de los subtipos H1, H2, H3, N1 y N2. Además de los virus de la gripe estacional que ya se encuentran en circulación, a principios de 2009 se identificó una nueva cepa H1N1 en humanos.[3]

Es importante establecer programas de vigilancia activa y tomar precauciones para el control de infecciones a fin de prevenir la transmisión de la influenza. El uso de ensayos que proporcionan resultados rápidos para identificar y diferenciar el agente infeccioso en pacientes infectados con la gripe estacional y la Gripe H1N1 de 2009 también constituye un factor importante a la hora de controlar de forma efectiva la influenza, elegir el tratamiento adecuado y prevenir brotes generalizados.

Principio del procedimiento

El ensayo Xpert Flu es una prueba diagnóstica *in vitro* automatizada y rápida para la detección cualitativa de la Influenza A, la Influenza B y el subtipo de la Influenza A H1N1 de 2009. Este ensayo se realiza con los sistemas Cepheid GeneXpert® Dx.

Los sistemas GeneXpert Dx automatizan e integran la purificación de muestras, la amplificación del ácido nucleico y la detección de la secuencia objetivo en muestras sencillas o complejas mediante ensayos de RT-PCR y PCR en tiempo real. El sistema consta de un instrumento, un ordenador personal y un software cargado previamente para ejecutar pruebas y visualizar los resultados. Estos sistemas requieren el uso de cartuchos GeneXpert desechables de un solo uso para los reactivos RT-PCR y PCR y los procesos de RT-PCR y PCR. Dado que los cartuchos son independientes, se minimiza el riesgo de contaminación cruzada entre muestras. Si desea obtener una descripción detallada de los sistemas, consulte el *Manual del operador del sistema GeneXpert Dx* pertinente.

El ensayo Xpert Flu incluye reactivos para la detección y diferenciación de la Influenza A, la Influenza B y el subtipo de Influenza A H1N1 de 2009 a partir de aspiraciones/lavados nasales (A/LN) y muestras nasofaríngeas (NF) mediante hisopo de pacientes sospechosos de sufrir influenza. También se incluyen en el cartucho un control de procesamiento de muestras (SPC) y un control de comprobación de sonda (PCC). El SPC es necesario para controlar el procesamiento adecuado de los virus objetivo y para monitorizar la presencia de inhibidores en la reacción de la PCR. Mediante el control de comprobación de sonda (PCC) se comprueba la rehidratación de los reactivos, el llenado del tubo de PCR en el cartucho, la integridad de la sonda y la estabilidad del fluorocromo.

Reactivos e instrumentos

Material suministrado

Σ El kit del ensayo Xpert Flu contiene reactivos suficientes para procesar 10 especímenes o muestras de control de calidad. El kit incluye los siguientes elementos:

- **Cartuchos del ensayo Xpert Flu con tubos de reacción integrados** — **10**
- **Perla 1 (liofilizada)** — **1 por cartucho**
  - Enzima transcriptasa inversa
  - Enzima Taq polimerasa
  - dNTP
  - Sonda
  - BSA (albúmina sérica bovina)
  - Sales
- **Perla 2 (liofilizada)** — **1 por cartucho**
  - Iniciadores
  - Sondas
  - dNTP
  - BSA (albúmina sérica bovina)
  - Sales
- **Perla 3 (liofilizada)** — **1 por cartucho**
  - Armored RNA® de control de preparación de muestras no infecciosas del control de procesamiento de muestras (SPC)
- **Reactivo de lisis** — **2 ml por cartucho**
  - Hidrocloruro de guanidina, surfactantes
- **Reactivo de lavado** — **0,5 ml por cartucho**
  - PEG, monotioglicerol, KCI, tampón Tris, EDTA, surfactantes, azida sódica
- **Reactivo de dilución** — **2 ml por cartucho**
  - Tampón Tris-EDTA, Tween 20
- Σ **Bolsa de reactivo del ensayo Xpert Flu** — **1 por kit**
- **Reactivo de unión** — **10 x 1 ml por ampolla**
  - agua, etanol
- **Pipetas de transferencia de 300 µl desechables** — **2 bolsas de 12 por kit**
- **CD** — **1 por kit**
  - Archivo de definición del ensayo (ADE)
  - Instrucciones para importar el ADE al software GX
  - Instrucciones

Notas:

- Las fichas de datos de seguridad de los materiales (MSDS) de todos los reactivos suministrados con este ensayo se pueden solicitar al Servicio de asistencia técnica de Cepheid o a través de la página web http://www.cepheid.com/tests-and-regeants/literature/msds/.
- La seroalbúmina bovina (BSA) contenida en este producto se ha fabricado exclusivamente a partir de plasma bovino recogido en los Estados Unidos. También la BSA se fabrica en Estados Unidos. No se alimentó a los animales con proteínas de rumiante ni otras proteínas de origen animal; los animales fueron sometidos a pruebas ante y post mortem. Durante el procesamiento no se produjo mezcla alguna del material con otras materias de origen animal.

Almacenamiento y manipulación

- Guarde los cartuchos y los reactivos del ensayo Xpert Flu a una temperatura comprendida entre 2-28 °C.
- No abra un cartucho hasta que esté preparado para realizar la prueba.
- No utilice los reactivos si observa que están turbios o se han decolorado.
- No use los cartuchos con fugas.

Material necesario no suministrado

- Sistema GeneXpert Dx (el número de referencia varía según la configuración): Instrumento GeneXpert, ordenador con software exclusivo, escáner de códigos de barras y Manual del operador.
- Impresora (consulte el *Manual del operador del sistema GeneXpert Dx* para conocer las indicaciones sobre compatibilidad).

Materiales disponibles, pero no suministrados

- Kit de recogida de muestras nasales, nº de catálogo de Cepheid NASL-100N-100.
- Controles de virus inactivos de ZeptoMetrix, nº de catálogo NATFLUA/B-6MC y NATFLUAH1N1-MC como controles positivos externos, y nº de catálogo NATCXVA9-MC (virus Coxsackie) como control negativo externo.

Advertencias y precauciones

- Trate todas las muestras biológicas, incluidos los cartuchos usados, como posibles agentes de transmisión de infecciones. Dado que es imposible determinar los posibles focos de infección, todas las muestras biológicas se deben tratar teniendo en cuenta las precauciones universales. Las directrices para la manipulación de muestras se pueden consultar en los U.S. Centers for Disease Control and Prevention (Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades de EE.UU.)[4,5] y el Clinical and Laboratory Standards Institute (Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio) (anteriormente National Committee for Clinical Laboratory Standards (Comité Nacional de Control de Estándares Clínicos de Laboratorio))[6].
- Siga los procedimientos de seguridad de su centro para trabajar con productos químicos y manipular las muestras biológicas.
- No reemplace los reactivos del ensayo Xpert Flu por otros reactivos.
- No abra la tapa del cartucho del ensayo Xpert Flu salvo para añadir la muestra y los reactivos.
- No use un cartucho que se haya caído o movido después de añadir la muestra y los reactivos.
- No use un cartucho con un tubo de reacción dañado.
- Cada cartucho del ensayo Xpert Flu de un solo uso se utiliza para procesar una prueba. No reutilice los cartuchos.
- Consulte con el personal de residuos medioambientales de su centro acerca del modo correcto de desechar los cartuchos usados y los reactivos sin utilizar. Este material puede mostrar características propias de los residuos peligrosos recogidas en la Ley de conservación y recuperación de recursos (RCRA) de la Agencia de Protección Ambiental (EPA) de EE.UU., lo que obligaría a cumplir ciertos requisitos a la hora de desecharlo. Consulte la normativa local y estatal, ya que puede diferir de la federal. Los centros situados fuera de EE.UU. deben consultar los requisitos sobre la eliminación de residuos peligrosos que se aplican en su país.
- Guarde el kit del ensayo Xpert Flu a una temperatura comprendida entre 2-28 °C.
- No abra un paquete de cartuchos hasta que esté preparado para realizar la prueba.

Recogida, transporte y almacenamiento de muestras

Las muestras procedentes de A/LN y las muestras NF obtenidas mediante hisopo se pueden recoger siguiendo los procedimientos estándar del centro del usuario y colocarse en el medio de transporte universal (tubos de MTU de 3 ml).

Las muestras deben transportarse a una temperatura de entre 2 y 8 °C, y se pueden almacenar hasta 72 horas a esa misma temperatura antes de procesarlas.

Procedimiento

Preparación del cartucho

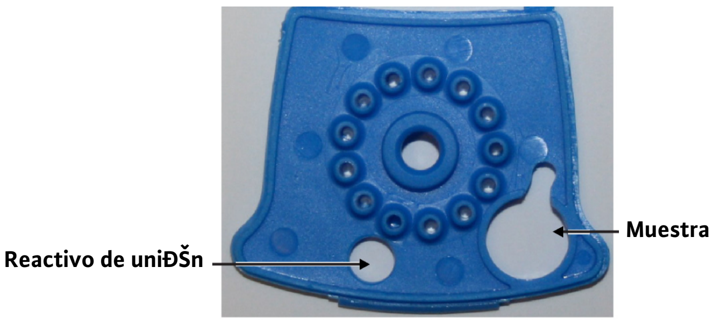
Importante: Inicie la prueba en un plazo de 60 minutos después de añadir la muestra y los reactivos al cartucho.

Para muestras NF mediante hisopo

1. Extraiga el cartucho y los reactivos del envase.
2. Mezcle la muestra invirtiendo el tubo de MTU cinco veces.
3. Abra la tapa del cartucho. Utilizando una pipeta de transferencia limpia (incluida), transfiera 300 µl del MTU al compartimento "S" del cartucho.
4. Dispense el reactivo de unión 1 en el compartimento 1 del cartucho. Apriete la ampolla hasta vaciar todo el contenido en el cartucho.
5. Cierre la tapa del cartucho.

Para muestras de A/LN

1. Utilizando una pipeta de transferencia limpia de 300 µl (incluida), transfiera 600 µl de la muestra (pipeteando 300 µl dos veces) en el tubo de MTU de 3 ml y, a continuación, tape el tubo.
2. Mezcle la muestra invirtiendo el tubo cinco veces.
3. Extraiga el cartucho y los reactivos del envase.
4. Abra la tapa del cartucho. Utilizando una pipeta de transferencia limpia de 300 µl (incluida), transfiera 300 µl de la muestra diluida al compartimento "S" del cartucho.
5. Dispense el reactivo de unión 1 en el compartimento 1 del cartucho. Apriete la ampolla hasta vaciar todo el contenido en el cartucho.
6. Cierre la tapa del cartucho.



Compartimento 1 = reactivo de unión 1, compartimento "S" = muestra

Figura 1. Cartucho del ensayo Xpert Flu (vista superior).

Inicio de la prueba

Importante: antes de empezar la prueba, asegúrese de haber importado el archivo de definición del ensayo Xpert Flu en el software. En esta sección se incluyen los pasos básicos para realizar la prueba con los sistemas GeneXpert DX. Si desea obtener instrucciones detalladas, consulte el *Manual del operador del sistema GeneXpert Dx* pertinente.

1. Encienda el equipo y el instrumento GeneXpert Dx.
2. En el escritorio de Windows®, haga doble clic en el icono de acceso directo a GeneXpert Dx.
3. Inicie una sesión en el software del sistema GeneXpert Dx con su nombre de usuario y contraseña.
4. En la ventana del sistema GeneXpert Dx, haga clic en **Create Test (Crear prueba)**. Aparece el cuadro de diálogo Scan Cartridge Barcode (Escanear código de barras de cartucho).
5. Escanee el código de barras del cartucho del ensayo Xpert Flu. Aparece la ventana **Create Test (Crear prueba)**. Utilizando la información del código de barras, el software rellenará automáticamente los cuadros de los siguientes campos: Select Assay (Seleccionar ensayo), Reagent Lot ID (Id. de lote de reactivos) y Cartridge SN (Nº de serie del cartucho).
6. En el cuadro **Sample ID (Id. de muestra)**, escanee o escriba el Id. de muestra. Asegúrese de escribir el Id. de muestra correcto. El Id. de muestra está asociado a los resultados de la prueba y se muestra en la ventana **View Results (Ver resultados)** y en todos los informes.
7. Haga clic en **Start Test (Iniciar prueba)**. En el cuadro de diálogo que aparece, escriba su contraseña.
8. Abra la puerta del módulo del instrumento mientras la luz esté parpadeando en verde y cargue el cartucho.
9. Cierre la puerta. La prueba se inicia y la luz verde deja de parpadear. Una vez finalizada la prueba, la luz se apaga.
10. Espere hasta que el sistema desbloquee la puerta para abrir la puerta del módulo y retirar el cartucho.
11. Deseche los cartuchos usados en un contenedor de residuos de muestras apropiado de acuerdo con las prácticas estándar del centro.

Visualización e impresión de los resultados

Si desea obtener instrucciones detalladas sobre cómo ver e imprimir los resultados, consulte el *Manual del operador del sistema GeneXpert Dx*.

CONTROL

Control de calidad

Cada prueba incluye un Control de procesamiento de muestra (SPC) y un Control de comprobación de sonda (PCC).

Control de procesamiento de muestras, SPC: garantiza que la muestra se ha procesado correctamente. El SPC es un Armored RNA® en forma de perla seca que se incluye en cada cartucho para comprobar que las muestras del virus se procesen de forma adecuada. El SPC comprueba si se ha producido la lisis del virus de la influenza en caso de que el organismo esté presente y verifica además si el procesamiento de la muestra es correcto. Además, este control también detecta la inhibición asociada a las muestras de las reacciones RT-PCR y PCR. El SPC debe ser positivo en una muestra negativa y puede ser negativo o positivo en una muestra positiva. El SPC es correcto si cumple los criterios de aceptación validados.

Control de comprobación de sonda (PCC): antes de iniciar la reacción en cadena de la polimerasa, el sistema GeneXpert Dx mide la señal de fluorescencia de las sondas para controlar la rehidratación de las perlas, el llenado del tubo de reacción, la integridad de la sonda y la estabilidad del fluorocromo. El PCC es correcto si cumple los criterios de aceptación validados.

Controles externos: los controles externos deben emplearse de acuerdo con los requisitos de las organizaciones de acreditación locales, estatales y federales, según corresponda.

Interpretación de los resultados

El sistema GeneXpert Dx interpreta los resultados automáticamente a partir de las señales de fluorescencia medidas y los algoritmos de cálculo integrados; dichos resultados se mostrarán en la ventana **View Results** (Ver resultados). Los resultados posibles son:

Flu A POSITIVE; 2009 H1N1 NOT DETECTED; Flu B NEGATIVE (Figura 2)

ARN objetivo de la Gripe A detectado; ARN de H1N1 de 2009 no detectado; ARN objetivo de la Gripe B no detectado.

- El objetivo de la Gripe A tiene un Uc dentro del rango válido y un punto final por encima de los parámetros mínimos.
- SPC – NA (not applicable); el SPC se ignora porque la amplificación del objetivo de la Gripe A puede competir con este control.
- Probe Check – PASS; todos los resultados de comprobación de sonda son aptos.

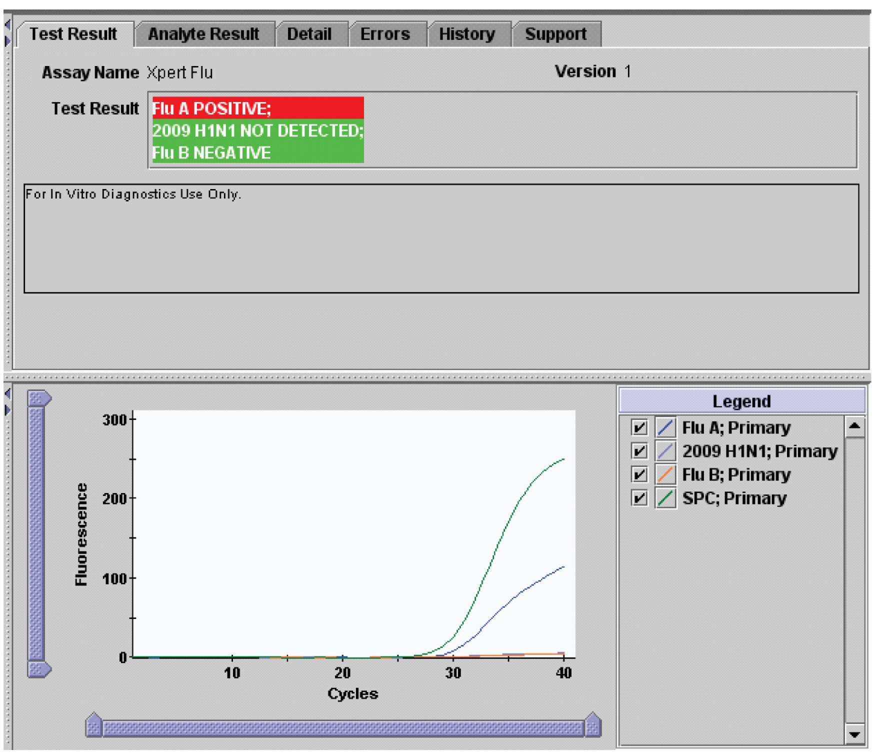


Figura 2. Ejemplo de resultado positivo para la Gripe A

Flu A POSITIVE; 2009 H1N1 DETECTED; Flu B NEGATIVE (Figura 3)

ARN objetivo de la Gripe A detectado; ARN objetivo de H1N1 de 2009 detectado; ARN objetivo de la Gripe B no detectado.

- El objetivo de la Gripe A tiene un Uc dentro del rango válido y un punto final por encima de los parámetros mínimos.
- El objetivo de H1N1 de 2009 tiene un Uc dentro del rango válido y un punto final por encima de los parámetros mínimos.
- SPC – NA (not applicable); el SPC se ignora porque la amplificación del objetivo de la Gripe A y H1N1 de 2009 puede competir con este control.
- Probe Check – PASS; todos los resultados de comprobación de sonda son aptos.

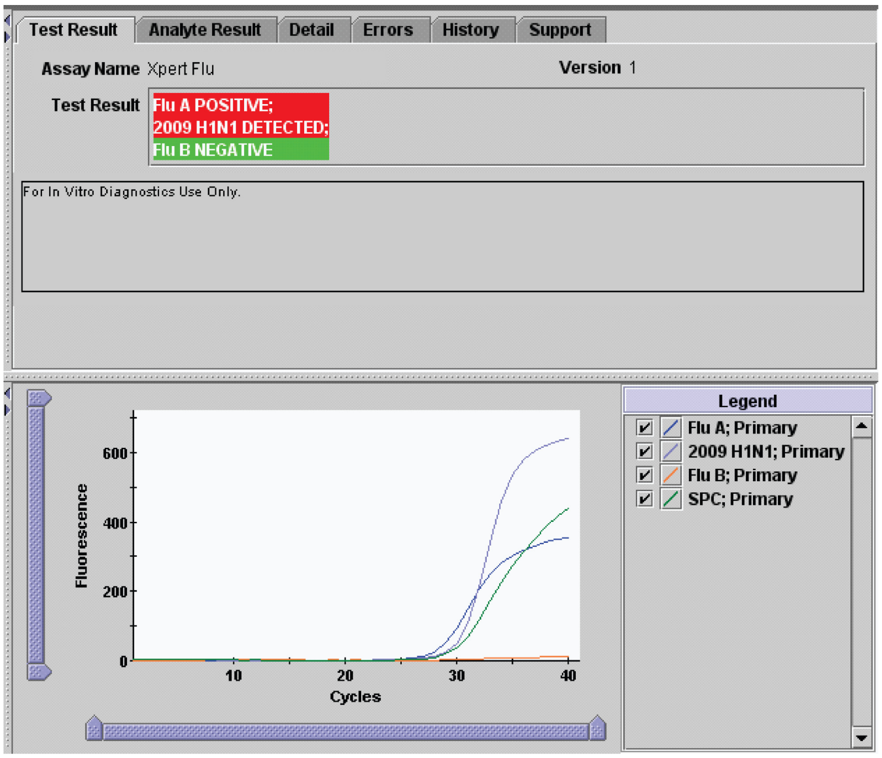


Figura 3. Ejemplo de resultado positivo para H1N1 de 2009

Flu A NEGATIVE; 2009 H1N1 NOT DETECTED; Flu B POSITIVE (Figura 4)

ARN objetivo de la Gripe B detectado; ARN objetivo de la Gripe A no detectado; ARN objetivo de H1N1 de 2009 no detectado.

- El objetivo de la Gripe B tiene un Uc dentro del rango válido y un punto final por encima de los parámetros mínimos.
- SPC – NA (not applicable); el SPC se ignora porque la amplificación del objetivo de la Gripe B puede competir con este control.
- Probe Check – PASS; todos los resultados de comprobación de sonda son aptos.

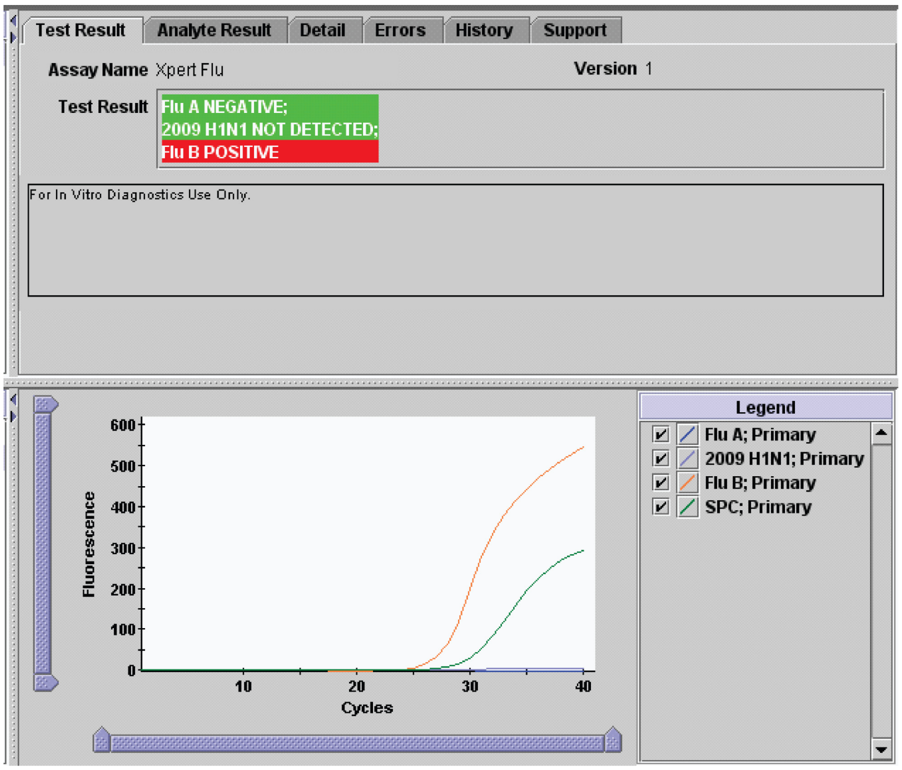


Figura 4. Ejemplo de resultado positivo para la Gripe B

Flu A NEGATIVE; 2009 H1N1 NOT DETECTED; Flu B NEGATIVE (Figura 5)

ARN objetivo de la Gripe A no detectado; ARN objetivo de H1N1 de 2009 no detectado; objetivo de la Gripe B no detectado. El SPC cumple los criterios de aceptación.

- No se han detectado los ARN objetivo de la Gripe A, H1N1 de 2009 y Gripe B.
- SPC – PASS; el SPC tiene un Uc dentro del rango válido y un punto final por encima de los parámetros mínimos.
- Probe Check – PASS; todos los resultados de comprobación de sonda son aptos.

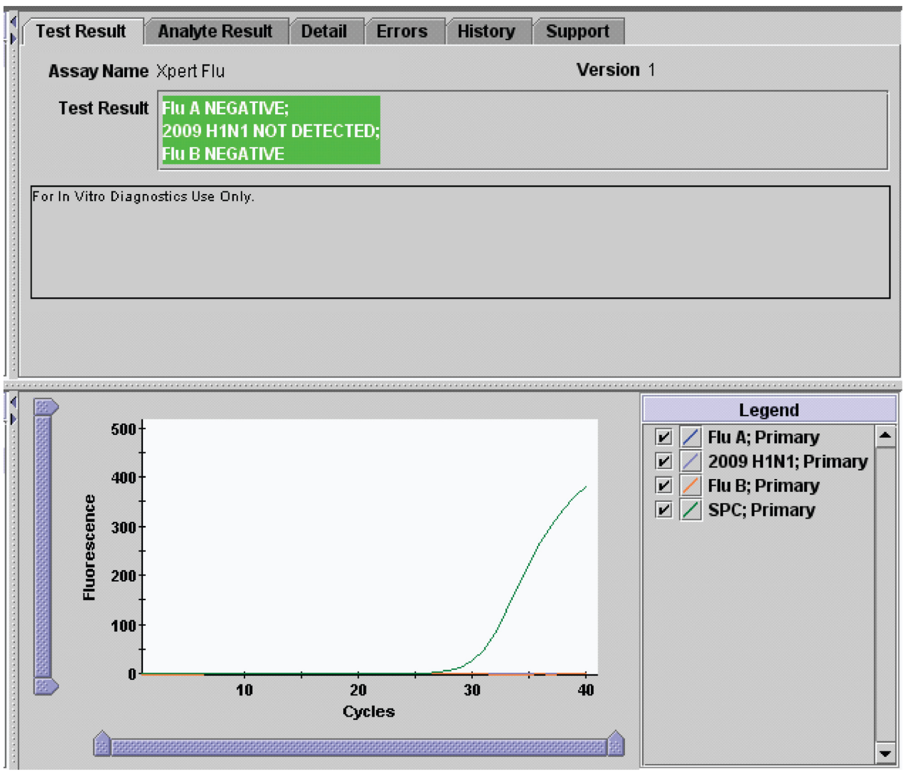


Figura 5. Ejemplo de resultado negativo

INVALID (Figuras 6 y 7)

1. El SPC no cumple los criterios de aceptación. No se puede determinar la presencia o ausencia de los ARN objetivo. Repita la prueba de acuerdo con las instrucciones de la sección Procedimiento de repetición de pruebas que se muestran a continuación.
   - SPC – FAIL; el resultado de SPC es negativo, el Uc de SPC no se encuentra dentro del rango válido y el punto final está por debajo de los parámetros mínimos.
   - Probe Check – PASS; todos los resultados de comprobación de sonda son aptos.

   o

2. No se puede determinar la presencia o ausencia del ARN objetivo de H1N1 de 2009. Repita la prueba de acuerdo con las instrucciones de la sección Procedimiento de repetición de pruebas que se muestran a continuación.
   - ARN objetivo de la Gripe A no detectado y ARN objetivo de H1N1 de 2009 detectado.
   - SPC – NA (not applicable); el SPC se ignora porque se ha amplificado un objetivo.
   - Probe Check – PASS; todos los resultados de comprobación de sonda son aptos.

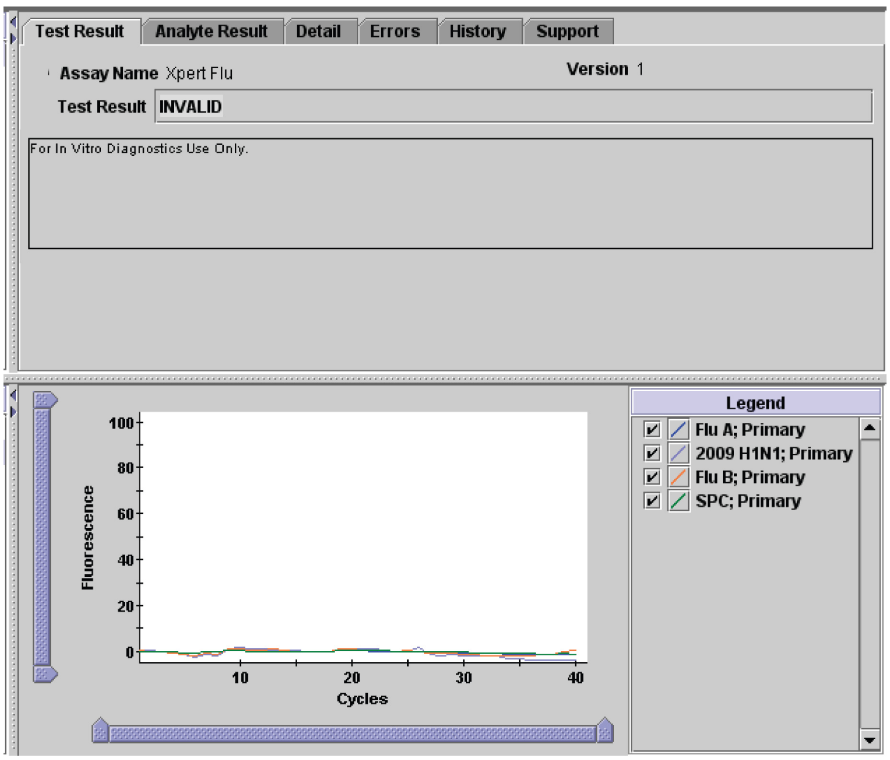


Figura 6. Ejemplo de resultado no válido (el SPC no cumple los criterios de aceptación)

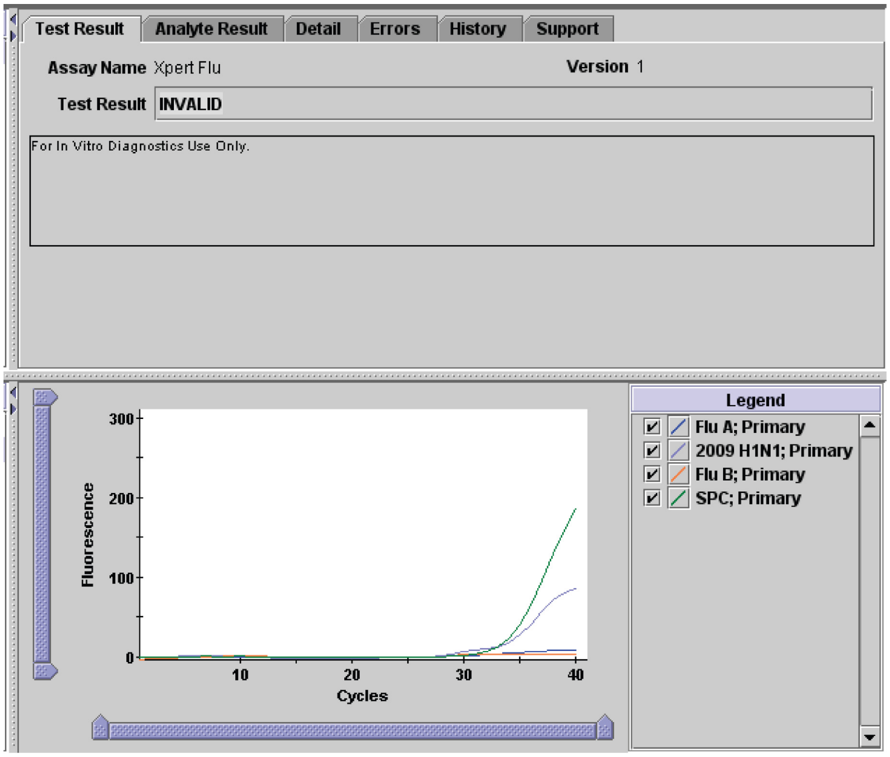


Figura 7. Ejemplo de resultado no válido (negativo para Gripe A y positivo para H1N1 de 2009)

ERROR

No se ha podido determinar la presencia o ausencia de los ARN objetivo de la Gripe A, H1N1 de 2009 y Gripe B. Repita la prueba de acuerdo con las instrucciones de la sección Procedimiento de repetición de pruebas que se muestran a continuación.

- 2009 H1N1 – NO RESULT
- Flu A – NO RESULT
- Flu B – NO RESULT
- SPC – NO RESULT
- Probe Check – FAIL*; al menos una de las comprobaciones de sonda ha fallado

* Si la comprobación de sonda es correcta, el error se deberá a que se ha superado la presión máxima o a un fallo de un componente del sistema.

NO RESULT

No se ha podido determinar la presencia o ausencia de los ARN objetivo de la Gripe A, H1N1 de 2009 y Gripe B. Repita la prueba de acuerdo con las instrucciones de la sección Procedimiento de repetición de pruebas que se muestran a continuación. Un NO RESULT indica que no se han recogido suficientes datos. Por ejemplo, si el operador detiene una prueba en curso.

- 2009 H1N1 – NO RESULT
- Flu A – NO RESULT
- Flu B – NO RESULT
- SPC – NO RESULT
- Probe Check – NA (not applicable)

Motivos para repetir el ensayo

Si obtiene alguno de los resultados de la prueba mencionados a continuación, repita la prueba de acuerdo con las instrucciones del procedimiento de repetición de pruebas que se describen en la siguiente sección.

- Un resultado INVALID (NO VÁLIDO) se debe al menos a una de las siguientes razones:
  - Se produjo un error con el control SPC;
  - El ARN objetivo de la Gripe A no se ha detectado y el ARN objetivo de H1N1 de 2009 se ha detectado;
  - La muestra no se ha procesado correctamente o se ha inhibido la reacción en cadena de la polimerasa.
- ERROR indica que se ha suspendido el ensayo. Las posibles causas son las siguientes: el tubo de reacción se había llenado de forma incorrecta, se detectó un problema de integridad de la sonda de reacción o se ha superado el límite máximo de presión.
- Un NO RESULT indica que no se han recogido suficientes datos. Por ejemplo, si el operador ha detenido una prueba en curso o se ha producido un fallo de alimentación.

Procedimiento de repetición de pruebas

Para repetir la prueba a causa de un resultado indeterminado, utilice un cartucho nuevo (no reutilice cartuchos) y reactivos nuevos.

En el caso de las muestras NF mediante hisopo, utilice 300 µl de la muestra restante del tubo de MTU original.

Para muestras de A/LN utilice 300 µl de la muestra diluida restante del tubo de MTU de 3 ml.

1. Extraiga un nuevo cartucho del envoltorio.
2. Mezcle la muestra invirtiendo el tubo cinco veces.
3. Abra la tapa del cartucho. Utilizando una pipeta de transferencia limpia de 300 µl (incluida), transfiera 300 µl de la muestra al compartimento “S” del cartucho.
4. Dispense el reactivo de unión 1 en el compartimento 1 del cartucho. Apriete la ampolla hasta vaciar todo el contenido en el cartucho.
5. Cierre la tapa del cartucho.

Limitaciones

- El rendimiento del ensayo Xpert Flu se ha validado sólo mediante los procedimientos proporcionados en estas instrucciones. Las modificaciones de estos procedimientos pueden alterar el rendimiento de la prueba.
- Los resultados del ensayo Xpert Flu se deben interpretar junto con otros datos clínicos y de laboratorio a disposición del médico.
- Se pueden obtener resultados erróneos debido a una recogida de muestras incorrecta, a que no se sigue el procedimiento de recogida recomendado o los procedimientos de manipulación o almacenamiento de muestras recomendados, en caso de error técnico o mezcla de la muestra, o bien, debido a que el número de organismos es demasiado reducido como para que la prueba los detecte. El estricto cumplimiento de las instrucciones del embalaje es necesario para evitar resultados erróneos.
- Las muestras altamente viscosas, resultantes de la adición de un 1,5% (p/v) y un 2,5% (p/v) de mucina dieron lugar a resultados falsos negativos con el ensayo Xpert Flu. También se observó la inhibición del ensayo Xpert Flu como resultado de la adición de un 1% (p/v) de mucina, lo que dio lugar a un retraso en la detección de la Influenza A, el subtipo de Influenza A H1N1 de 2009 y la Influenza B.

Características de funcionamiento

Resultados clínicos

Se evaluaron las características de rendimiento del ensayo Xpert Flu en muestras archivadas en dos centros de EE.UU.

Los sujetos eran individuos cuya atención de rutina requería la recogida de muestras NF mediante hisopo y procedentes de A/LN para la realización de pruebas de la influenza. En el caso de los sujetos aptos, se obtuvieron alícuotas de restos de muestras para la realización de pruebas con el ensayo Xpert Flu y pruebas de referencia.

Se calculó el rendimiento del ensayo Xpert Flu en relación a los resultados de referencia (es decir, cultivo viral seguido de ensayo directo de fluorescencia (DFA), con la confirmación secuencial de todas las muestras positivas de Influenza A) para las muestras en las que el cultivo viral se realizó antes de la congelación. En el caso de las muestras en las que el cultivo viral no se realizó antes de la congelación, el rendimiento del ensayo Xpert Flu se determinó en relación al ensayo Prodesse ProFlu+™ y la secuenciación. Todas las muestras positivas para Influenza A identificadas mediante cultivo viral o el ensayo ProFlu+ se secuencian para diferenciar el subtipo de la Influenza A H1N1 de 2009 de otros subtipos de Influenza A.

Resultados generales

Se analizaron un total de 270 muestras NF obtenidas mediante hisopo archivadas para la Influenza A, el subtipo de la Influenza A H1N1 de 2009 y la influenza B mediante el ensayo Xpert Flu y cultivos. Se analizaron un total de 357 muestras archivadas de A/LN para la Influenza A, el subtipo de la Influenza A H1N1 de 2009 y la influenza B mediante el ensayo Xpert Flu y ProFlu+. Todas las muestras positivas para Influenza A identificadas mediante cultivo viral o el ensayo ProFlu+ se secuenciaron para diferenciar el subtipo de la Influenza A H1N1 de 2009 de otros subtipos de Influenza A.

Con las muestras NF mediante hisopo, el ensayo Xpert Flu demostró una sensibilidad y especificidad para la detección de la Influenza A de 97,5% y 100%, respectivamente, en relación a un cultivo viral más DFA, con confirmación de secuencias de todas las cepas positivas de la Influenza A (Tabla 1). La sensibilidad y especificidad del ensayo Xpert Flu para el subtipo de Influenza A H1N1 de 2009 a partir de muestras NF mediante hisopo fueron ambas de un 100% (Tabla 2). La sensibilidad y especificidad del ensayo Xpert Flu para la Influenza B a partir de muestras NF mediante hisopo fueron de un 93,8% y un 99,6%, respectivamente (Tabla 3).

Tabla 1. Rendimiento del ensayo Xpert Flu frente al método de referencia con muestras NF mediante hisopo: Influenza A

		Cultivo viral + DFA		
		Pos.	**Neg.**	**Total**
Ensayo Xpert Flu	**Pos.**	115	0	115
	Neg.	3	152	155
	Total	118	152	270

Sensibilidad:	97,5% (95% IC: 92,8-99,5)
Especificidad:	100% (95% IC: 97,6-100)
Exactitud:	98,9% (95% IC: 96,8-99,8)
PPV:	100% (95% IC: 96,8-100)
NPV:	98,1% (95% IC: 94,5-99,6)

Tabla 2. Rendimiento del ensayo Xpert Flu frente al método de referencia con muestras NF mediante hisopo: N1H1 de 2009

		Cultivo viral + DFA/secuenciación		
		Pos.	**Neg.**	**Total**
Ensayo Xpert Flu	**Pos.**	85	0	85
	Neg.	0	182	182
	Total	85	182	267

Sensibilidad:	100% (95% IC: 95,6-100)
Especificidad:	100% (95% IC: 98,0-100)
Exactitud:	100% (95% IC: 98,6-100)
PPV:	100% (95% IC: 95,6-100)
NPV:	100% (95% IC: 98,0-100)

Tabla 3. Rendimiento del ensayo Xpert Flu frente al método de referencia con muestras NF mediante hisopo: Influenza B

		Cultivo viral + DFA		
		Pos.	**Neg.**	**Total**
Ensayo Xpert Flu	**Pos.**	30	1	31
	Neg.	2	237	239
	Total	32	238	270
	Sensibilidad:	93,8% (95% IC: 79,2-99,2)		
	Especificidad:	99,6% (95% IC: 97,7-100)		
	Exactitud:	98,9% (95% IC: 96,8-99,8)		
	PPV:	96,8% (95% IC: 83,3-99,9)		
	NPV:	99,2% (95% IC: 97-99,9)		

En relación al ensayo ProFlu+ con confirmación de secuencias de todas las cepas positivas de Influenza A, el ensayo Xpert Flu identificó un 99,2% de las muestras de A/LN positivas para Influenza A y el 100% de las muestras negativas para Influenza A (Tabla 4). El ensayo Xpert Flu identificó un 97,9% de las muestras de A/LN positivas para el subtipo de Influenza A H1N1 de 2009 y el 100% de las muestras negativas para dicho subtipo (Tabla 5). El ensayo Xpert Flu identificó el 100% de las muestras de A/LN positivas para Influenza B y el 100% de las muestras negativas para esta gripe (Tabla 6).

Tabla 4. Rendimiento del panel A de Xpert Flu frente al método de referencia con muestras de A/LN: Influenza A

		ProFlu+		
		Pos.	**Neg.**	**Total**
Ensayo Xpert Flu	**Pos.**	125	0	125
	Neg.	1	231	232
	Total	126	231	357
	Sensibilidad:	99,2% (95% IC: 95,7-100)		
	Especificidad:	100% (95% IC: 98,4-100)		
	Exactitud:	99,7% (95% IC: 98,5-100)		
	PPV:	100% (95% IC: 97,1-100)		
	NPV:	99,6% (95% IC: 97,6-100)		

Tabla 5. Rendimiento del panel A de Xpert Flu frente al método de referencia con muestras de A/LN: H1N1 de 2009

		ProFlu+/secuenciación		
Ensayo Xpert Flu		**Pos.**	**Neg.**	**Total**
	Pos.	94	0	94
	Neg.	2	261	263
	Total	96	261	357
		Sensibilidad:	97,9% (95% IC: 92,7-99,8)	
		Especificidad:	100% (95% IC: 98,6-100)	
		Exactitud:	99,4% (95% IC: 98-99,9)	
		PPV:	100% (95% IC: 96,1-100)	
		NPV:	99,2% (95% IC: 98,6-100)	

Tabla 6. Rendimiento del panel A de Xpert Flu frente al método de referencia con muestras de A/LN: Influenza B

		ProFlu+		
Ensayo Xpert Flu		**Pos.**	**Neg.**	**Total**
	Pos.	40	0	40
	Neg.	0	317	317
	Total	40	317	357
		Sensibilidad:	100% (95% IC: 91,2-100)	
		Especificidad:	100% (95% IC: 98,8-100)	
		Exactitud:	100% (95% IC: 99-100)	
		PPV:	100% (95% IC: 91,2-100)	
		NPV:	100% (95% IC: 98,8-100)	

De los ensayos Xpert Flu llevados a cabo con muestras NF mediante hisopo aptas, el 98,9% (267/270) de estas muestras se analizaron correctamente en el primer intento. Las tres restantes arrojaron resultados indeterminados en el primer intento (1 INVALID" y 2 "ERROR"). Estas tres muestras se analizaron correctamente en el segundo intento. De los ensayos Xpert Flu llevados a cabo con muestras de A/LN aptas, el 95,5% (342/358) de estas muestras se analizaron correctamente en el primer intento. Las 16 restantes arrojaron resultados indeterminados en el primer intento (4 "INVALID", 11 "ERROR" y 1 "NO RESULT"). Quince de estas 16 muestras se analizaron correctamente en el segundo intento.

Rendimiento analítico

Sensibilidad analítica (límite de detección)

Se realizaron estudios para determinar los intervalos de confianza del 95% para el límite analítico de detección (LoD) de 2 cepas de Influenza A estacional (H1N1), 2 de Influenza A estacional (H3N2), 5 de Influenza A H1N1 de 2009 y 2 de Influenza B diluidas en una matriz nasofaríngea de sustitución. La matriz de sustitución constaba de un 1% de sangre humana, un 2,5% de mucina y un 0,85% de cloruro sódico. El límite de detección se define como la menor concentración ($TCID_{50}$/ml de la dosis infecciosa de cultivo de tejido) por muestra que puede distinguirse, de forma reproducible, a partir de muestras negativas con un 95% de confianza o la concentración más baja a la que 19 de 20 réplicas resultan positivas. Se analizó cada cepa en réplicas de 20 por concentración de virus.

Los intervalos de estimación y confianza se determinaron mediante una regresión logística con datos (número de resultados positivos por número de réplicas en cada nivel) tomados en todo el intervalo de concentraciones analizadas. Los intervalos de confianza se determinaron con estimaciones de probabilidad máxima según los parámetros del modelo logístico, utilizando la matriz de varianza-covarianza. Las estimaciones del punto LoD y los intervalos de confianza superior e inferior del 95% para cada cepa analizada se resumen en las tablas 7 a 10.

Tabla 7. Intervalos de confianza del 95% para el LoD analítico: subtipo H1N1 de la Influenza A estacional

Id. de la cepa: subtipo H1N1 de la Influenza A	95% inferior IC	LoD ($TCID_{50}$/ml)	Superior 95% IC
Influenza A/H1/Brisbane/59/07	1	1,3	1,9
Influenza A/H1/Nueva Caledonia/20/1999	5,9	7,3	11,7

Tabla 8. Intervalos de confianza del 95% para el LoD analítico: Influenza A estacional H3N2

Id. de la cepa: Influenza A H3N2	95% inferior IC	LoD ($TCID_{50}$/ml)	Superior 95% IC
Influenza A/H3/Brisbane/10/07	2,1	2,5	3,3
Influenza A/H3/Wisconsin/67/05	5	5,9	7,9

Tabla 9. Intervalos de confianza del 95% para el LoD analítico: subtipo H1N1 de 2009 de la Influenza A

Id. de la cepa: H1N1 de 2009	95% inferior IC	LoD ($TCID_{50}$/ml)	Superior 95% IC
Influenza A/Gripe porcinaNY/01/2009	1,1	1,4	2,1
Influenza A/Gripe porcinaNY/02/2009	4	4,8	7,3
Influenza A/Gripe porcinaNY/03/2009	3,3	3,5	4,1
Influenza A/Canadá/6294	66,3	77,1	105,4
Influenza A/WI/629-S1/2009	15	16,2	19,1

Tabla 10. Intervalos de confianza del 95% para el LoD analítico: Influenza B

Id. de la cepa: subtipo H1N1 de la Influenza A	95% inferior IC	LoD ($TCID_{50}$/ml)	Superior 95% IC
Influenza B/Florida/02/06	1,2	1,5	2,2
Influenza B/Florida/07/04	41,3	50,6	72,9

Especificidad analítica (reactividad cruzada)

La especificidad analítica del ensayo Xpert Flu se evaluó mediante el análisis de un panel de 40 cultivos consistente en 18 cepas víricas, 21 bacterianas y 1 de hongos que representaban patógenos respiratorios comunes o que pueden encontrarse en la nasofaringe. Se analizaron tres réplicas de todas las cepas bacterianas y de hongos en concentraciones $\geq 10^6$ UFC/ml. Se analizaron tres réplicas de todos los virus a concentraciones $\geq 10^4$ $TCID_{50}$/ml. Se incluyeron en el estudio controles positivos y negativos. La especificidad analítica fue del 100%. Los resultados se muestran en la Tabla 11.

Tabla 11. Especificidad analítica del ensayo Xpert Flu

Cepa	Concentración (por cartucho)	Influenza A	Influenza A H1N1 de 2009	Influenza B
Control positivo 1: Influenza A/Influenza B	N/A	+	-	+
Control positivo 2: subtipo H1N1 de 2009 de la Influenza A	N/A	+	+	-
Control negativo	N/A	-	-	-
Adenovirus tipo 7A	1×10^6 $TCID_{50}$/ml	-	-	-
Adenovirus tipo 1	1×10^6 $TCID_{50}$/ml	-	-	-
Coronavirus humano 229E	1×10^6 $TCID_{50}$/ml	-	-	-
Coronavirus humano OC43	1×10^4 $TCID_{50}$/ml	-	-	-
Citomegalovirus*	1×10^5 copias/ml	-	-	-
Enterovirus tipo 71	1×10^6 $TCID_{50}$/ml	-	-	-
Virus de Epstein-Barr	1×10^5 $TCID_{50}$/ml	-	-	-
Virus parainfluenza tipo 1	1×10^5 $TCID_{50}$/ml	-	-	-
Virus parainfluenza tipo 2	1×10^6 $TCID_{50}$/ml	-	-	-
Virus parainfluenza tipo 3	1×10^6 $TCID_{50}$/ml	-	-	-
Virus del sarampión	1×10^6 $TCID_{50}$/ml	-	-	-
Metaneumovirus humano	1×10^6 $TCID_{50}$/ml	-	-	-
Virus de las paperas	1×10^6 $TCID_{50}$/ml	-	-	-
Virus sincicial respiratorio A	1×10^6 $TCID_{50}$/ml	-	-	-
Virus sincicial respiratorio B	1×10^6 $TCID_{50}$/ml	-	-	-
HSV humano tipo 1	1×10^6 $TCID_{50}$/ml	-	-	-
Rinovirus humano tipo 4	1×10^6 $TCID_{50}$/ml	-	-	-
Ecovirus 11	1×10^6 $TCID_{50}$/ml	-	-	-
*Bordetella pertussis**	1×10^6 copias/ml	-	-	-
Chlamydia pneumoniae	1×10^6 UFC/ml	-	-	-
Corynebacterium xerosis	1×10^6 UFC/ml	-	-	-
Escherichia coli	1×10^6 UFC/ml	-	-	-
Proteus vulgaris	1×10^6 UFC/ml	-	-	-
Proteus mirabilis	1×10^6 UFC/ml	-	-	-
Klebsiella pneumoniae	1×10^6 UFC/ml	-	-	-
Haemophilus influenzae	1×10^6 copias/ml	-	-	-
Lactobacillus crispatus	1×10^6 UFC/ml	-	-	-
Legionella pneumophila	1×10^6 UFC/ml	-	-	-
Moraxella catarrhalis	1×10^6 UFC/ml	-	-	-
Mycobacterium tuberculosis (cepa BCG)	1×10^6 UFC/ml	-	-	-
Mycoplasma pneumoniae	1×10^6 UFC/ml	-	-	-
Neisseria meningitides	1×10^6 UFC/ml	-	-	-
Neisseria Cinneria	1×10^6 UFC/ml	-	-	-
Pseudomonas aeruginosa	1×10^6 UFC/ml	-	-	-
Staphylococcus aureus	1×10^6 UFC/ml	-	-	-
Staphylococcus epidermidis	1×10^6 UFC/ml	-	-	-
Streptococcus pneumoniae	1×10^6 UFC/ml	-	-	-
Streptococcus pyogenes	1×10^6 UFC/ml	-	-	-
Streptococcus salivarius	1×10^6 UFC/ml	-	-	-
Candida albicans	1×10^6 UFC/ml	-	-	-

*Se analizó el ácido nucleico para citomegalovirus y Bordetella pertussis.

Reactividad analítica (inclusividad)

Se evaluó la reactividad analítica del ensayo Xpert Flu en comparación con diversas cepas de Influenza A (subtipos H1N1, H3N2, H5N2, H5N1 y H7N3), el subtipo H1N1 de 2009 de la Influenza A y la Influenza B. De ellas, se incluyeron los subtipos de la Influenza A H1N1 (12), H3N2 (7), H1N1 de 2009 (6), H5N1 (1), H5N2 (1) y H7N3 (1), y la Influenza B (11). Se analizaron tres réplicas de cada cepa vírica a 5 – 500 $TCID_{50}$/ml. Los resultados se muestran en la Tabla 12.

Tabla 12. Reactividad analítica (inclusividad) del ensayo Xpert Flu

Cepa vírica	Concentración ($TCID_{50}$/ml)	Influenza A	Influenza A H1N1 de 2009	Influenza B
Influenza A/Denver/1/57 (H1N1)	500	+	-	-
Influenza A/NuevaYork/55/2004 (H1N1)	500	+	-	-
Influenza A/Mal/302/54 (H1N1)	50	+	-	-
Influenza A/Nueva Jersey/8/76 (H1N1)	500	+	-	-
Influenza A/NWS/33 (H1N1)	5	+	-	-
Influenza A/PR/8/34 (H1N1)	500	+	-	-
Influenza A/Taiwán/42/06 (H1N1)	500	+	-	-
Influenza A/WS/33 (H1N1)	5	+	-	-
Influenza A/Gripe porcina/1976/31 (Gripe porcina H1N1)	500*	+	-	-
Influenza A/Gripe porcina/Iowa/15/30 (Gripe porcina H1N1)	500*	+	-	-
Influenza A/Brisbane/59/07 (H1N1)	5	+	-	-
Influenza A/NuevaCaledonia/20/1999 (H1N1)	50	+	-	-
Influenza A/Victoria/3/75 (H3N2)	500	+	-	-
Influenza A/Aichi2/68 (H3N2)	500	+	-	-
Influenza A/Hong Kong/8/68 (H3N2)	50	+	-	-
Influenza A/Hawái/15/2001 (H3N2)	500	+	-	-
Influenza A/Port Chalmers/1/73 (H3N2)	500	+	-	-
Influenza A/Brisbane/10/07 (H3N2)	10	+	-	-
Influenza A/Wisconsin/67/05 (H3N2)	10	+	-	-
Influenza A/Gripe porcinaNY/01/2009 (09 H1N1)	10	+	+	-
Influenza A/Gripe porcinaNY/02/2009 (09 H1N1)	100	+	+	-
Influenza A/Gripe porcinaNY/03/2009 (09 H1N1)	10	+	+	-
Influenza A/California/4/2009 (09 H1N1)	5	+	+	-
Influenza A/Canadá/6294 (09 H1N1)	500	+	+	-
Influenza A/WI/929-S1 (09 H1N1)	100	+	+	-
Influenza A/Mallard/WI/34/75 (H5N2)	3 pg/µl^^	+	-	-
Influenza A/Anhui/02/2005/PR8-IBCDC-RG5 (H5N1)	0,122 pg/µl^^	+	-	-
Influenza A/gripe aviar/NJ/15086-3/94 (H7N3)	5 pg/µl^^	+	-	-
Influenza B/Allen/45	500	-	-	+
Influenza B/Florida/02/06	10	-	-	+
Influenza B/Florida/04/06	500	-	-	+
Influenza B/Florida/07/04	50	-	-	+
Influenza B/GL/1739/54	500	-	-	+
Influenza B/Hong Kong/5/72	500	-	-	+
Influenza B/Lee/40	500	-	-	+
Influenza B/Malasia/2506/04	500	-	-	+
Influenza B/Maryland/1/59	500	-	-	+
Influenza B/Panamá/45/90	500	-	-	+
Influenza B/Taiwán/2/62	50^	-	-	+

*Concentración expresada en PFU/ml; ^concentración expresada en CEID50/ml; ^^concentración expresada en picogramos/µl.

Estudio de sustancias interferentes

En un estudio no clínico, se evaluaron sustancias potencialmente interferentes que pueden estar presentes en la nasofaringe directamente en relación al rendimiento del ensayo Xpert Flu. Las sustancias exógenas potencialmente interferentes de la nasofaringe son, entre otras: la sangre, las secreciones nasales o mucosa y los medicamentos nasales y para la garganta utilizados para aliviar la congestión, la sequedad nasal, la irritación y los síntomas del asma y la alergia. Estas sustancias se recogen en la Tabla 13 junto con los ingredientes activos y las concentraciones analizadas. Las muestras altamente viscosas, resultantes de la adición de un 1,5% (p/v) y un 2,5% (p/v) de mucina dieron lugar a resultados falsos negativos con el ensayo Xpert Flu. También se observó la inhibición del ensayo Xpert Flu como resultado de la adición de un 1% (p/v) de mucina, lo que dio lugar a un retraso en la detección de la Influenza A, el subtipo de Influenza A H1N1 de 2009 y la Influenza B.

Tabla 13. Sustancias potencialmente interferentes en el ensayo Xpert Flu

Sustancia	Descripción/ingrediente activo	Concentración analizada
Sangre (humana)	N/A	2% (v/v)
Mucina	Proteína mucina purificada (glándula submaxilar bovina o porcina)	2,5%, 1,5%, 1% y 0,5% (p/v)
Gotas nasales Neo-Synephrine®	Fenilefrina HCI	15% (v/v)
Aerosol nasal Anefrin	Hidrocloruro de oximetazolina	15% (v/v)
Gel nasal Zicam®	Luffa opperculata, Galphimia glauca, sulfuro hidroclórico de histamina	5% (v/v)
Aerosol nasal salino	Cloruro de sodio con conservantes	15% (v/v)
Ungüento nasal con antibióticos	Mupirocina	10 mg/ml
Antibacteriano, sistémico	Tobramicina	4 μg/ml
Grageas para la garganta, anestésico y analgésico oral	Mentol	1,7 mg/ml mentol

Estudio de contaminación por arrastre

Se realizó un estudio para demostrar que los cartuchos independientes de un solo uso GeneXpert evitan la contaminación por arrastre en muestras negativas analizadas después de muestras altamente positivas en el mismo módulo GeneXpert. El estudio consistía en procesar una muestra negativa en el mismo módulo GeneXpert en que se acababa de procesar una muestra muy elevada del subtipo de Influenza A H1N1 de 2009 (aproximadamente 10^6 $TCID_{50}$/prueba) o una muestra de Influenza B (aproximadamente 10^6 $TCID_{50}$/prueba). Este esquema de análisis se repitió 20 veces en 4 módulos GeneXpert realizando un total de 88 experimentos con un resultado de 40 muestras positivas y 48 negativas. Las 40 muestras positivas se analizaron correctamente resultando positivas para el subtipo de Influenza A H1N1 de 2009 o para Influenza B. Las 48 muestras negativas se analizaron correctamente con un resultado negativo para Gripe A, H1N1 de 2009 no detectado y negativo para Gripe B.

Reproducibilidad

Se analizó por duplicado un panel de 10 muestras con concentraciones diferentes de Influenza A, Influenza B y el subtipo de Influenza A H1N1 de 2009 en 10 días diferentes y en tres centros distintos (10 muestras × 2 veces/día × 10 días × 3 centros). Se usó un lote de ensayo Xpert Flu en cada uno de los tres centros de prueba. Los ensayos Xpert Flu se realizaron siguiendo el procedimiento del ensayo Xpert Flu. Los resultados se resumen en la Tabla 14.

Tabla 14. Resumen de los resultados de reproducibilidad[a]

Id. de la muestra	Centro 1	Centro 2	Centro 4	% de correspondencia total por muestra
Negativo	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (60/60)
Gripe A positivo moderado	100% (20/20)	100% (19/19)[b]	100% (20/20)	100% (59/59)
Gripe A positivo bajo	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (60/60)
Gripe A negativo alto	100% (20/20)	95% (19/20)	90% (18/20)	95% (57/60)
H1N1 de 2009 positivo moderado	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (60/60)
H1N1 de 2009 positivo bajo	100% (20/20)	100% (19/19)[a]	100% (20/20)	100% (59/59)
H1N1 de 2009 negativo alto	94,7% (18/19)[b]	100% (20/20)	89,5% (17/19)[b]	94,8% (55/58)[c]
Gripe B positivo moderado	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (60/60)
Gripe B positivo bajo	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (60/60)
Gripe B negativo alto	90.0% (18/20)	95% (19/20)	55% (11/20)	80% (48/60)
% de correspondencia total	98,5% (196/199)	99% (196/198)	93,5% (186/199)	97% (578/596)

[a] n=19 porque una muestra resultó indeterminada y no se volvió a analizar.
[b] n=19 porque la repetición produjo un resultado indeterminado.
[c] 9/55 muestras negativas para H1N1 de 2009 obtuvieron un resultado positivo para Gripe A válido, ya que se detectó la señal de la Gripe A. Para obtener un resultado positivo para H1N1 de 2009 es necesario detectar las señales tanto de la Gripe A como de H1N1 de 2009.

Bibliografía

1. Petric M, Comanor L, Petti CA. Role of the laboratory in diagnosis of influenza during seasonal epidemics and potential pandemics. J Infect Dis. 2006;194:S98-110.

2. Schweiger B, Zadow I, Heckler R, et al. Application of a fluorogenic PCR assay for typing and subtyping of influenza viruses in respiratory samples. J Clin Micro. 2000;38:1552-1558.

3. http://www.cdc.gov Acceso el 22 de febrero de 2010.

4. Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades. Biosafety in Microbiological and Biomedical laboratories. Richmond JY y McKinney RW (eds) (1993). Número de publicación del HHS (Departamento de Salud y Servicios Humanos de EE.UU.) (CDC) 93-8395.

5. Interim Biosafety Guidance for All Individuals Handling Clinical Specimens or Isolates Containing 2009-H1N1 Influenza A Virus (Novel H1N1), including Vaccine Strains, 15 de agosto de 2009; (http://www.cdc.gov/h1n1flu/guidelines_labworkers.htm).

6. Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (anteriormente denominado Comité Nacional de Estándares Clínicos y de Laboratorio). Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline. Document M29 (consultar la última edición).

Asistencia

Si desea obtener asistencia, póngase en contacto con Cepheid usando los datos de contacto siguientes. No olvide facilitar el número de serie del instrumento y el Id. del lote de reactivos si realiza una llamada o envía un correo electrónico.

Estados Unidos

Para acceder al servicio técnico, utilice los siguientes datos de contacto:

Tel.: +1.888.838.3222

Correo electrónico: techsupport@cepheid.com

Puede ponerse en contacto con el servicio de asistencia técnica de Cepheid por teléfono de lunes a viernes, de 5 de la mañana a 5 de la tarde (hora del Pacífico).

Unión Europea

Para acceder al servicio técnico, utilice los siguientes datos de contacto:

Tel.: +33.563.82.53.19

Fax: +33.563.82.53.01

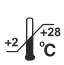
Correo electrónico: techsupport@cepheideurope.fr

Otras oficinas

Póngase en contacto con su representante local de Cepheid.

Tabla de símbolos

Tabla 15. Significado de los símbolos

Símbolo	Significado
REF	Número de referencia
IVD	Producto sanitario para diagnóstico *in vitro*
	No reutilizar
	Fabricante
	Contiene cantidad suficiente para <n> pruebas
CONTROL	Control
EC REP	Representante autorizado en la Unión Europea
	Limitaciones de temperatura
	Riesgo biológico

Fabricante

Cepheid
904 Caribbean Drive
Sunnyvale, CA 94089-1189

Teléfono: +1.408.541.4191
Fax: +1.408.541.4192

EC REP Representante autorizado

Cepheid Europa
Vira-Solelh
81470 Maurens-Scopont
Francia

Tel.: +33.563.82.53.00
Fax: +33.563.82.53.01
Correo electrónico: cepheid@cepheideurope.fr

CE IVD

Italiano

Solo per uso diagnostico *in vitro*

Nome registrato

Xpert® Flu

Nome comune o usuale

Saggio Xpert Flu

Uso previsto

Il saggio Cepheid® Xpert Flu è un saggio automatizzato di RT-PCR multipla in tempo reale per il rilevamento qualitativo e la differenziazione *in vitro* dell'RNA virale dell'Influenza A, dell'Influenza B e dell'Influenza H1N1 del 2009. Il saggio Xpert Flu utilizza campioni di aspirati/lavaggi nasali e tamponi nasofaringei raccolti da pazienti con segni e sintomi di infezione respiratoria concomitanti a fattori di rischio clinici ed epidemiologici. Il saggio Xpert Flu è stato concepito come ausilio nella diagnosi dell'influenza.

Riepilogo e spiegazione

L'influenza è un'infezione virale contagiosa del tratto respiratorio che si contrae spesso durante la stagione invernale. La trasmissione dell'influenza avviene principalmente per via aerea (ossia tramite tosse o starnuti). I sintomi generalmente includono febbre, brividi, cefalea, malessere, tosse e congestione sinusale. Anche se sono meno comuni, possono essere presenti anche sintomi gastrointestinali (nausea, vomito e diarrea), specialmente nei bambini. La comparsa dei sintomi, in genere, avviene entro due giorni dall'esposizione a una persona infetta. Come complicanza dell'influenza può svilupparsi una polmonite, che è causa di un aumento della morbilità e della mortalità nelle popolazioni pediatrica, anziana e immunocompromessa[1,2].

I virus dell'influenza sono classificati nei tipi A, B e C, di cui i primi due causano la maggior parte delle infezioni nell'uomo. Il virus dell'Influenza A è il tipo più comune nell'uomo, generalmente è responsabile delle epidemie di influenza stagionale e può causare pandemie. I virus dell'Influenza A possono infettare anche gli animali, ad esempio volatili, suini ed equini. Le infezioni dovute all'Influenza B sono limitate per lo più all'uomo e raramente sono causa di epidemie. I virus dell'Influenza A si suddividono in sottotipi in base a due proteine di superficie: l'emoagglutinina (H) e la neuraminidasi (N). L'influenza stagionale normalmente è causata da combinazioni dei sottotipi H1, H2, H3, N1 e N2. Oltre ai virus dell'influenza stagionale già circolanti, all'inizio del 2009 è stato identificato negli uomini un nuovo ceppo, H1N1[3].

Programmi di sorveglianza attiva e precauzioni per il controllo dell'infezione sono essenziali per prevenire la trasmissione dell'influenza. Anche l'uso di saggi che forniscano risultati rapidi per l'identificazione e la differenziazione dell'agente di infezione in pazienti infetti da influenza stagionale e influenza H1N1 2009 è essenziale per un controllo efficace, la scelta di un trattamento adeguato e la prevenzione di epidemie influenzali di vaste proporzioni.

Principio della procedura

Il saggio Xpert Flu è un'analisi diagnostica automatizzata *in vitro* per il rilevamento qualitativo dell'Influenza A, dell'Influenza B e del sottotipo H1N1 2009 dell'Influenza A. Il saggio viene eseguito su sistemi Cepheid GeneXpert® Dx System.

Questi sistemi consentono di automatizzare e integrare la purificazione dei campioni, l'amplificazione degli acidi nucleici e il rilevamento della sequenza target in campioni semplici o complessi utilizzando i saggi RT-PCR e PCR in tempo reale. Il sistema è costituito da uno strumento, un personal computer e un software già installato per l'esecuzione delle analisi e la visualizzazione dei risultati. I sistemi richiedono l'uso di cartucce GeneXpert monouso che contengono i reagenti per RT-PCR e PCR e dove si svolgono i processi RT-PCR e PCR. Poiché cartucce sono indipendenti, il rischio di contaminazione tra campioni è ridotto al minimo. Per una descrizione completa dei sistemi, fare riferimento al *Manuale dell'operatore di GeneXpert Dx System* appropriato.

Il saggio Xpert Flu comprende reagenti per l'identificazione e la differenziazione dell'Influenza A, dell'Influenza B e del sottotipo H1N1 2009 dell'Influenza A direttamente da campioni di aspirati/lavaggi nasali e tamponi nasofaringei di pazienti con sospetta influenza. La cartuccia include anche un controllo per il trattamento del campione (SPC, Sample Processing Control) e un controllo per la verifica della sonda (PCC, Probe Check Control). L'SPC serve a controllare l'idoneità del trattamento dei virus target e a monitorare la presenza di inibitori nella reazione della PCR. Il PCC verifica la reidratazione dei reagenti, il riempimento della provetta della PCR nella cartuccia, l'integrità della sonda e la stabilità del colorante.

Reagenti e strumenti

Materiale fornito

Σ Il kit per il saggio Xpert Flu contiene reagenti sufficienti per il trattamento di 10 campioni o campioni di controllo qualità. Il kit contiene il seguente materiale:

- **Cartucce per saggio Xpert Flu con provette di reazione integrate** — **10**
- **Microsfera 1 (congelata-essiccata)** — **1 per cartuccia**
  - Enzima trascrittasi inversa
  - Enzima Taq polimerasi
  - dNTP
  - Sonda
  - BSA (albumina di siero bovino)
  - Sali
- **Microsfera 2 (congelata-essiccata)** — **1 per cartuccia**
  - Primer
  - Sonde
  - dNTP
  - BSA (albumina di siero bovino)
  - Sali
- **Microsfera 3 (congelata-essiccata)** — **1 per cartuccia**
  - SPC, controllo preparazione campione non infetto Armored RNA®
- **Reagente di lisi** — **2,0 mL per cartuccia**
  - Idrocloruro di guanidina, tensioattivi
- **Reagente di lavaggio** — **0,5 mLper cartuccia**
  - PEG, monotioglicerolo, KCl, tampone Tris, EDTA, tensioattivi, azide di sodio
- **Reagente di eluizione** — **2,0 mL per cartuccia**
  - Tampone Tris-EDTA, Tween 20
- Σ **Sacca reagente per saggio Xpert Flu** — **1 per kit**
- **Reagente legante** — **10 x 1,0 mL per fiala**
  - acqua, etanolo
- **Pipette di trasferimento monouso da 300 µL** — **2 confezioni da 12 per kit**
- **CD** — **1 per kit**
  - File di definizione saggio ADF (Assay Definition File)
  - Istruzioni per l'importazione del file ADF nel software GX
  - Foglio illustrativo

Notas:

- Le schede MSDS (Material Safety Data Sheet) con i dati relativi alla sicurezza per tutti i reagenti forniti con questo saggio possono essere richieste al supporto tecnico Cepheid o sono disponibili all'indirizzo Web http://www.cepheid.com/tests-and-regeants/literature/msds/.
- La sieroalbumina bovina (BSA) di questo prodotto è stata prodotta esclusivamente da plasma bovino di origine statunitense. Anche la produzione della BSA viene eseguita negli Stati Uniti. Gli animali non sono stati nutriti con proteine bovine o altre proteine animali; gli animali hanno superato i test ante mortem e post mortem. Durante l'elaborazione, il materiale non è stato miscelato con altro materiale animale.

Conservazione e manipolazione

- Conservare le cartucce e i reagenti per saggio Xpert Flu a una temperatura compresa tra 2 e 28 °C.
- Aprire la cartuccia solo immediatamente prima di eseguire l'analisi.
- Non utilizzare reagenti intorbiditi o con alterazioni nella colorazione.
- Non utilizzare cartucce che presentano perdite.

Materiali necessari ma non forniti

- GeneXpert Dx System (il numero di catalogo varia in base alla configurazione): strumento GeneXpert, computer con software proprietario, scanner di codici a barre e manuale dell'operatore
- Stampante (per le linee guida sulla compatibilità consultare il *Manuale dell'operatore di GeneXpert Dx System*)

Materiali disponibili ma non forniti

- Kit raccolta nasale, n. catalogo Cepheid NASL-100N-100.
- Controlli virus inattivati ZeptoMetrix, n. catalogo NATFLUA/B-6MC e n. catalogo NATFLUAH1N1-MC come controlli positivi esterni, e n. catalogo NATCXVA9-MC (Coxsackie virus) come controllo negativo esterno.

Avvertenze e precauzioni

- Gestire tutti i campioni biologici, incluse le cartucce usate, come potenziali veicoli di trasmissione di agenti infettivi. Dal momento che spesso è impossibile sapere quale campione potrebbe essere infetto, tutti i campioni biologici devono essere gestiti adottando le massime precauzioni. Le linee guida per la manipolazione dei campioni sono disponibili negli Stati Uniti presso i Centri per la prevenzione e il controllo delle malattie[4,5] e il Clinical and Laboratory Standards Institute (ex National Committee for Clinical Laboratory Standards)[6].
- Per la gestione di sostanze chimiche e campioni biologici, attenersi alle procedure di sicurezza del proprio istituto.
- Non sostituire i reagenti per saggio Xpert Flu con altri reagenti.
- Aprire il coperchio della cartuccia per saggio Xpert Flu solo quando viene aggiunto il campione e il reagente.
- Non utilizzare una cartuccia che è caduta o è stata scossa dopo l'aggiunta del campione e del reagente.
- Non utilizzare una cartuccia con una provetta di reazione danneggiata.
- Ogni cartuccia monouso per saggio Xpert Flu deve essere adoperata per l'esecuzione di una sola analisi. Non riutilizzare le cartucce usate.
- Per il corretto smaltimento delle cartucce usate e dei reagenti inutilizzati, rivolgersi al personale addetto allo smaltimento dei rifiuti ambientali del proprio istituto. Questi materiali potrebbero rientrare tra i rifiuti pericolosi di cui alla normativa RCRA (Resource Conservation and Recovery Act) dell'EPA (Environmental Protection Agency), l'ente federale statunitense per la protezione dell'ambiente, e potrebbero prevedere requisiti di smaltimento specifici. Controllare le normative nazionali e locali, in quanto potrebbero essere diverse dalle normative sullo smaltimento vigenti negli Stati Uniti. Gli istituti al di fuori degli Stati Uniti devono verificare i requisiti sullo smaltimento dei rifiuti pericolosi previsti nel proprio paese.
- Conservare il kit per saggio Xpert Flu a una temperatura compresa tra 2 e 28 °C.
- Aprire la confezione della cartuccia solo immediatamente prima di eseguire l'analisi.

Raccolta, trasporto e conservazione del campione

I campioni di aspirati/lavaggi nasali e tamponi nasofaringei possono essere raccolti seguendo le procedure standard del proprio istituto e collocati in provette UTM (Universal Transport Medium) da 3 mL.

I campioni devono essere trasportati a una temperatura compresa tra 2-8 °C e possono essere conservati per non oltre 72 ore a 2-8 °C prima del trattamento.

Procedura

Preparazione della cartuccia

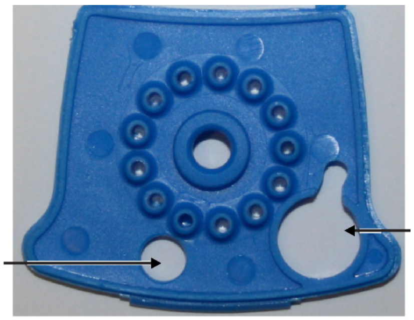
Importante: iniziare l'analisi entro 60 minuti dall'aggiunta del campione e del reagente nella cartuccia.

Per i campioni di tamponi nasofaringei

1. Togliere la cartuccia e i reagenti dalla confezione.
2. Mescolare il campione capovolgendo cinque volte la provetta UTM.
3. Aprire il coperchio della cartuccia. Adoperando una pipetta di trasferimento pulita (fornita), trasferire 300 µL di contenuto della provetta UTM nella camera "S" della cartuccia.
4. Aggiungere il reagente legante 1 nella camera della cartuccia 1. Spremere la fiala fino ad aggiungere tutto il contenuto alla cartuccia.
5. Chiudere il coperchio della cartuccia.

Per i campioni di aspirati/lavaggi nasali

1. Adoperando una pipetta di trasferimento pulita da 300 µL (fornita), trasferire 600 µL di campione (pipettando due volte 300 µL) nella provetta UTM da 3 mL e chiuderla.
2. Mescolare il campione capovolgendo cinque volte la provetta.
3. Togliere la cartuccia e i reagenti dalla confezione.
4. Aprire il coperchio della cartuccia. Adoperando una pipetta di trasferimento pulita da 300 µL (fornita), trasferire 300 µL di campione diluito nella camera "S" della cartuccia.
5. Aggiungere il reagente legante 1 nella camera della cartuccia 1. Spremere la fiala fino ad aggiungere tutto il contenuto alla cartuccia.
6. Chiudere il coperchio della cartuccia.



Camera 1 = Reagente legante 1, Camera “S” = Campione

Figura 1. Cartuccia per saggio Xpert Flu (vista dall'alto)

Avvio dell'analisi

Importante: prima di iniziare l'analisi, accertarsi che il file di definizione per saggio Xpert Flu sia stato importato nel software. In questa sezione è riportata la procedura di base per l'esecuzione dell'analisi sui sistemi GeneXpert Dx System. Per istruzioni dettagliate, consultare il *Manuale dell'operatore del sistema GeneXpert Dx* appropriato.

1. Accendere il computer e lo strumento GeneXpert Dx.
2. Sul desktop di Windows®, fare doppio clic sull'icona di collegamento di GeneXpert Dx.
3. Accedere al software del sistema GeneXpert Dx con il proprio nome utente e la propria password.
4. Nella finestra di GeneXpert Dx System, fare clic su **Create Test** (Crea analisi). Verrà visualizzata la finestra di dialogo Scan Cartridge Barcode (Analizza codice a barre cartuccia).
5. Eseguire la scansione del codice a barre della cartuccia per saggio Xpert Flu. Viene visualizzata la finestra **Create Test** (Crea analisi). Utilizzando le informazioni del codice a barre, il software completa automaticamente le caselle dei seguenti campi: Select Assay (Seleziona saggio), Reagent Lot ID (ID lotto reagente) e Cartridge SN (NS cartuccia).
6. Nella casella **Sample ID** (ID campione), eseguire la scansione dell'ID del campione o digitarlo con attenzione. L'ID del campione è associato al risultato dell'analisi, viene visualizzato nella finestra **View Results** (Visualizza risultati) e viene riportato in tutti i referti.
7. Fare clic su **Start Test** (Avvia analisi). Nella finestra di dialogo visualizzata, digitare la propria password.
8. Aprire lo sportello del modulo dello strumento con la spia verde lampeggiante e caricare la cartuccia.
9. Chiudere lo sportello. L'analisi inizia e la spia verde smette di lampeggiare. Al termine dell'analisi, la spia si spegne.
10. Attendere che il sistema sblocchi il meccanismo di chiusura dello sportello prima di aprire lo sportello del modulo e togliere la cartuccia.
11. Gettare le cartucce utilizzate negli appositi contenitori dei rifiuti per lo smaltimento dei campioni rispettando le procedure standard dell'istituto.

Visualizzazione e stampa dei risultati

Per istruzioni dettagliate sulla visualizzazione e la stampa dei risultati, consultare il *Manuale dell'operatore di GeneXpert Dx System*.

CONTROL

Controllo di qualità

Ogni analisi include un controllo SPC per il trattamento del campione e un controllo PCC per la verifica della sonda.

SPC: consente di accertarsi che il campione sia stato trattato correttamente. L'SPC è un Armored RNA® sotto forma di microsfera secca , è inclusa in ciascuna cartuccia e serve per verificare che il virus del campione venga trattato correttamente. L'SPC consente di accertarsi che la lisi del virus dell'influenza sia avvenuta, se l'organismo è presente, e di verificare la correttezza del trattamento del campione. Questo controllo, inoltre, rileva l'inibizione associata al campione delle reazioni RT-PCR e PCR. L'SPC deve essere positivo in un campione negativo e può essere negativo o positivo in un campione positivo. L'SPC è accettabile se soddisfa i criteri di accettazione convalidati.

PCC: prima dell'inizio della reazione PCR, GeneXpert Dx System misura il segnale di fluorescenza proveniente dalle sonde per monitorare la reidratazione delle microsfere, il riempimento della provetta di reazione, l'integrità della sonda e la stabilità del colorante. Il PCC è accettabile se soddisfa i criteri di accettazione convalidati.

Controlli esterni: i controlli esterni devono essere utilizzati in conformità ai requisiti delle organizzazioni di accreditamento locali e nazionali applicabili.

Interpretazione dei risultati

I risultati vengono interpretati automaticamente da GeneXpert Dx System utilizzando i segnali di fluorescenza misurati e gli algoritmi di calcolo integrati, e visualizzati chiaramente nella finestra **View Results** (Visualizza risultati). I risultati possibili sono:

Flu A POSITIVE; 2009 H1N1 NOT DETECTED; Flu B NEGATIVE (Influenza A positivo; H1N1 2009 non rilevato; Influenza B negativo) (Figura 2)

RNA target dell'Influenza A rilevato; RNA H1N1 2009 non rilevato; RNA target dell'Influenza B non rilevato.

- Il target dell'influenza A ha un valore Ct compreso nell'intervallo valido e un valore finale superiore all'impostazione minima.
- SPC – NA (non applicabile): l'SPC viene ignorato, poiché l'amplificazione del target dell'Influenza A può interferire con questo controllo.
- Verifica della sonda – PASS (Superata): tutti i risultati della verifica della sonda sono accettabili.

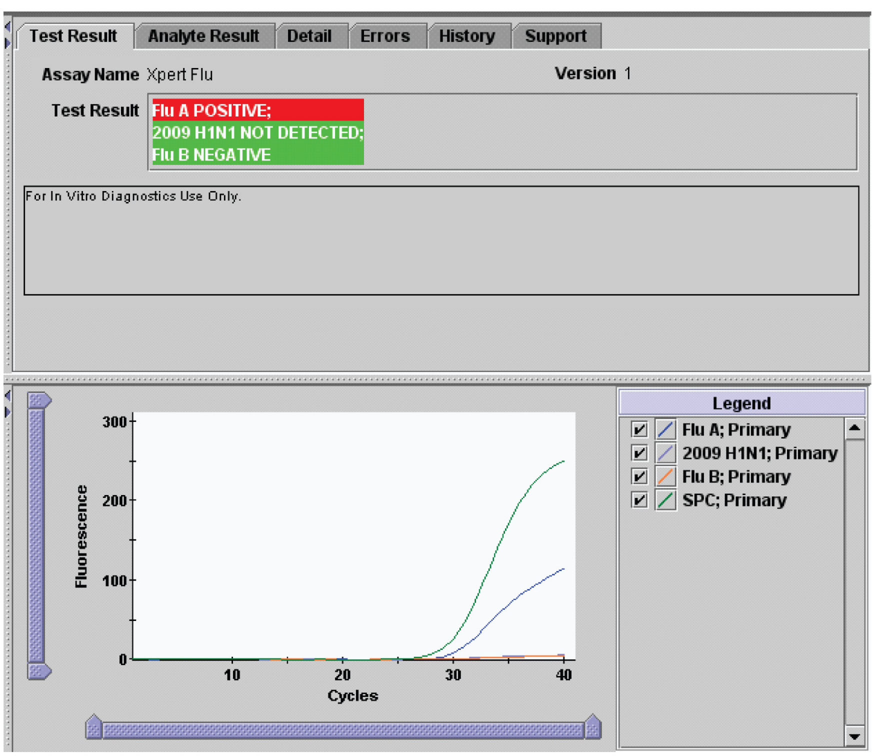


Figura 2. Esempio di risultato di positività all'Influenza A

Flu A POSITIVE; 2009 H1N1 DETECTED; Flu B NEGATIVE (Influenza A positivo; H1N1 2009 rilevato; Influenza B negativo) (Figura 3)

RNA target dell'Influenza A rilevato; RNA target dell'H1N1 2009 rilevato; RNA target dell'Influenza B non rilevato.

- Il target dell'influenza A ha un valore Ct compreso nell'intervallo valido e un valore finale superiore all'impostazione minima.
- Il target dell'H1N1 2009 ha un valore Ct compreso nell'intervallo valido e un valore finale superiore all'impostazione minima.
- SPC – NA (non applicabile): l'SPC viene ignorato, poiché l'amplificazione del target dell'Influenza A e dell'H1N1 2009 può interferire con questo controllo.
- Verifica della sonda – PASS (Superata): tutti i risultati della verifica della sonda sono accettabili.

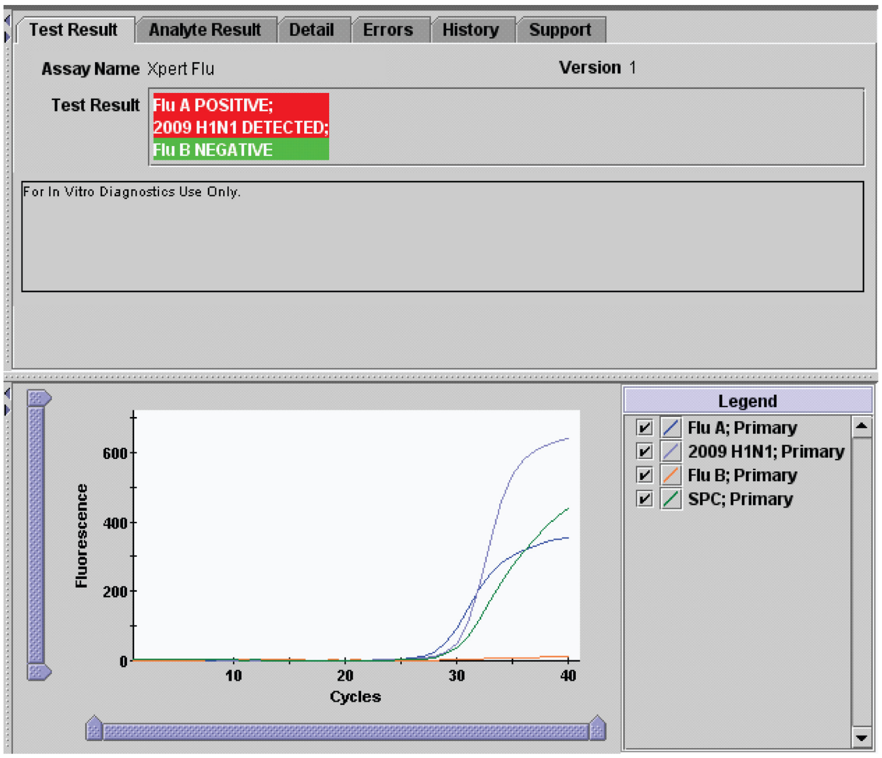


Figura 3. Esempio di risultato di positività all'H1N1 2009

Flu A NEGATIVE; 2009 H1N1 NOT DETECTED; Flu B POSITIVE (Influenza A negativo; H1N1 2009 non rilevato; Influenza B positivo) (Figura 4)

RNA target dell'Influenza B rilevato; RNA target dell'Influenza A non rilevato; RNA target dell'H1N1 2009 non rilevato.

- Il target dell'influenza B ha un valore Ct compreso nell'intervallo valido e un valore finale superiore all'impostazione minima.
- SPC – NA (non applicabile): l'SPC viene ignorato, poiché l'amplificazione del target dell'Influenza B può interferire con questo controllo.
- Verifica della sonda – PASS (Superata): tutti i risultati della verifica della sonda sono accettabili.

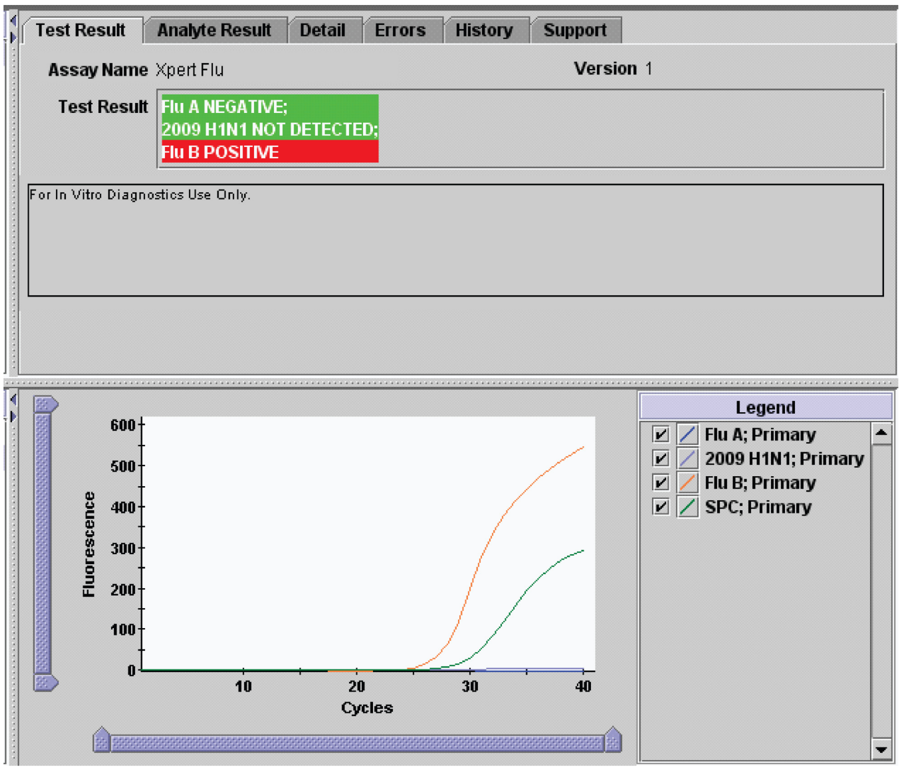


Figura 4. Esempio di risultato di positività all'influenza B

Flu A NEGATIVE; 2009 H1N1 NOT DETECTED; Flu B NEGATIVE (Influenza A negativo; H1N1 2009 non rilevato; Influenza B negativo) (Figura 5)

RNA target dell'Influenza A non rilevato; RNA target dell'H1N1 2009 non rilevato; target dell'Influenza B non rilevato. L'SPC soddisfa i criteri di accettabilità.

- RNA target dell'Influenza A, dell'H1N1 2009 e dell'Influenza B non rilevati.
- SPC – PASS: l'SPC ha un valore Ct compreso nell'intervallo valido e un valore finale superiore all'impostazione minima.
- Verifica della sonda – PASS (Superata): tutti i risultati della verifica della sonda sono accettabili.

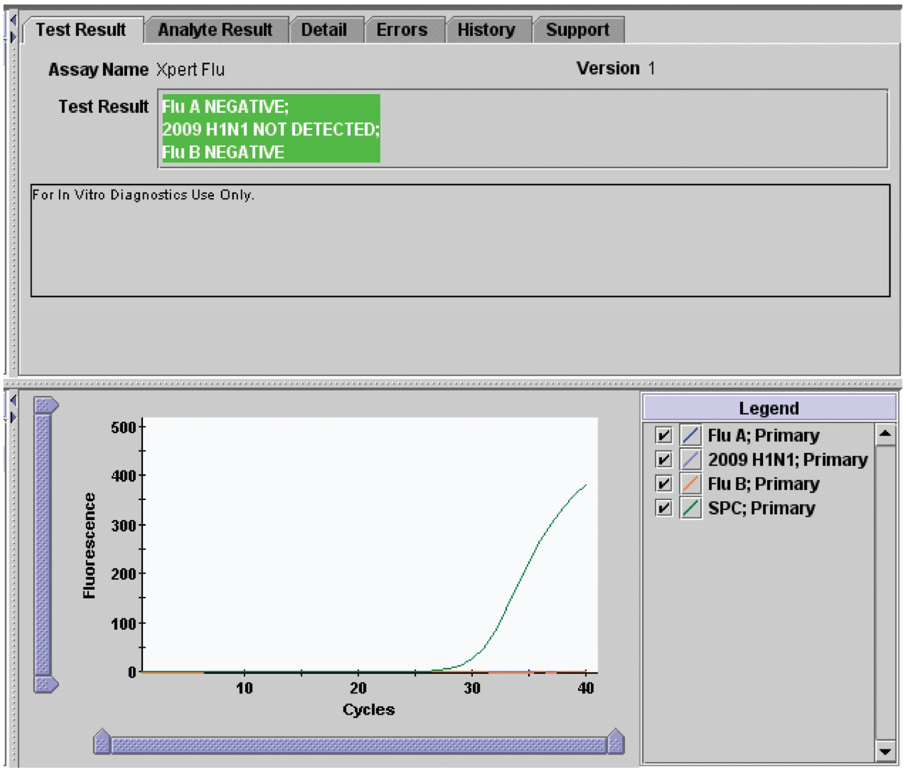


Figura 5. Esempio di risultato negativo

INVALID (Non valido) (Figure 6 e 7)

1. L'SPC non soddisfa i criteri di accettabilità. Non è possibile determinare la presenza o l'assenza degli RNA target. Ripetere l'analisi seguendo le istruzioni della sezione Procedura per la ripetizione dell'analisi riportata di seguito.
   - SPC – FAIL (Non riuscito): il risultato SPC è negativo, il valore Ct dell'SPC non rientra nell'intervallo di validità e il valore finale è inferiore all'impostazione minima.
   - Verifica della sonda – PASS (Superata): tutti i risultati della verifica della sonda sono accettabili.

   oppure

2. Non è possibile determinare la presenza o l'assenza dell'RNA target dell'H1N1 2009. Ripetere l'analisi seguendo le istruzioni della sezione Procedura per la ripetizione dell'analisi riportata di seguito.
   - RNA target dell'Influenza A non rilevato e RNA target dell'H1N1 2009 rilevato.
   - SPC – NA (non applicabile): l'SPC viene ignorato a causa di un target amplificato.
   - Verifica della sonda – PASS (Superata): tutti i risultati della verifica della sonda sono accettabili.

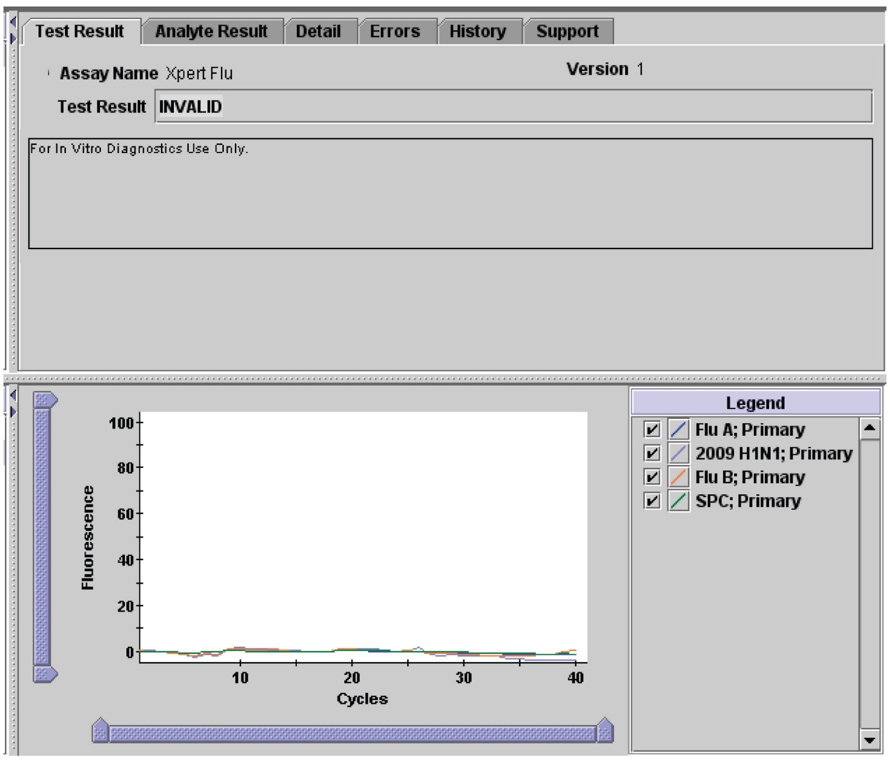


Figura 6. Esempio di risultato non valido (l'SPC non soddisfa i criteri di accettazione)

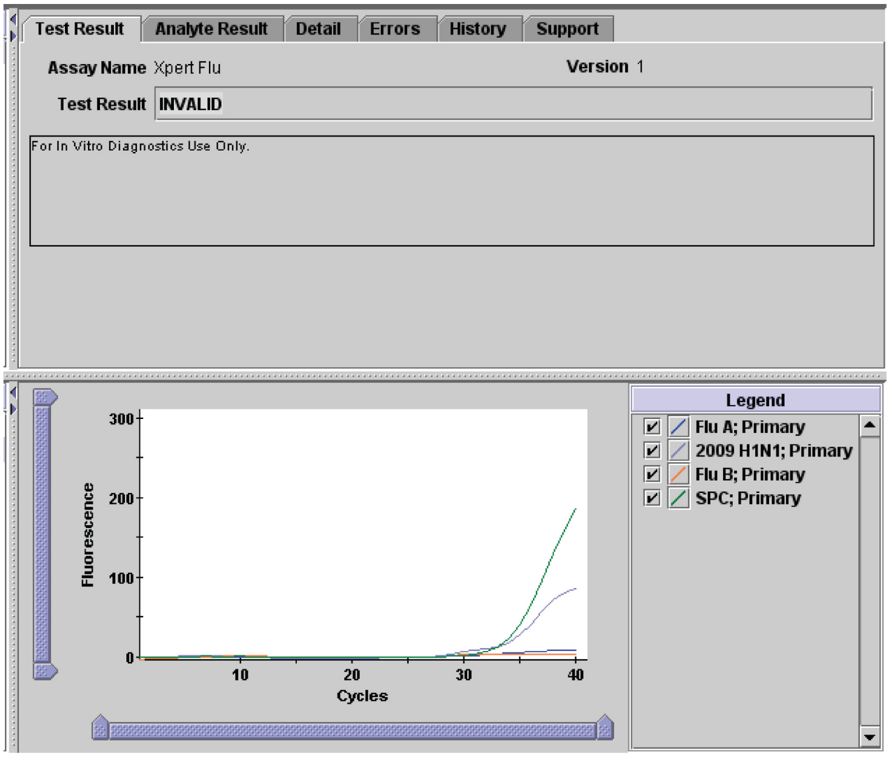


Figura 7. Esempio di risultato non valido (Influenza A negativo e H1N1 2009 positivo)

ERROR (ERRORE)

Non è possibile determinare la presenza o l'assenza degli RNA target dell'Influenza A, dell'H1N1 2009 e dell'Influenza B. Ripetere l'analisi seguendo le istruzioni della sezione Procedura per la ripetizione dell'analisi riportata di seguito.

- 2009 H1N1 – NO RESULT (H1N1 2009 - Nessun risultato)
- Flu A – NO RESULT (Influenza A - Nessun risultato)
- Flu B – NO RESULT (Influenza B - Nessun risultato)
- SPC – NO RESULT (SPC - Nessun risultato)
- Verifica della sonda – FAIL* (Non riuscita): errori in uno o in tutti i risultati della verifica della sonda

* Se la verifica della sonda è riuscita, l'errore deriva dal superamento del limite massimo di pressione o da un problema di un componente del sistema.

NO RESULT (Nessun risultato)

Non è possibile determinare la presenza o l'assenza degli RNA target dell'Influenza A, dell'H1N1 2009 e dell'Influenza B. Ripetere l'analisi seguendo le istruzioni della sezione Procedura per la ripetizione dell'analisi riportata di seguito. NO RESULT (Nessun risultato) indica che sono stati raccolti dati insufficienti. L'operatore, ad esempio, ha interrotto un'analisi in corso.

- 2009 H1N1 – NO RESULT (H1N1 2009 - Nessun risultato)
- Flu A – NO RESULT (Influenza A - Nessun risultato)
- Flu B – NO RESULT (Influenza B - Nessun risultato)
- SPC – NO RESULT (SPC - Nessun risultato)
- Probe Check – NA (Non applicabile)

Motivi per ripetere il saggio

Se si ottiene uno dei risultati riportati di seguito, ripetere l'analisi seguendo le istruzioni della sezione Procedura per ripetizione dell'analisi riportata di seguito.

- Un risultato INVALID (Non valido) indica una o più situazioni di seguito elencate:
  - L'SPC di controllo non è riuscito
  - Non è stato rilevato l'RNA target dell'Influenza A ed è stato rilevato l'RNA target dell'H1N1 2009
  - Il campione non è stato trattato correttamente o la PCR è stata inibita
- Un risultato ERROR (errore) indica che il saggio è stato interrotto. Cause probabili: riempimento non corretto della provetta di reazione, rilevamento di un problema di integrità con la sonda del reagente o superamento del limite massimo di pressione.
- NO RESULT (Nessun risultato) indica che sono stati raccolti dati insufficienti. L'operatore, ad esempio, ha interrotto un'analisi in corso oppure si è verificata un'interruzione di corrente.

Procedura per la ripetizione dell'analisi

Per ripetere l'analisi di un risultato non determinato, adoperare una nuova cartuccia (non riutilizzare la cartuccia) e nuovi reagenti.

Per tamponi nasofaringei, utilizzare 300 µL del campione rimasto nella provetta UTM originale.

Per aspirati/lavaggi nasali, utilizzare 300 µL del campione diluito rimasto nella provetta UTM da 3 mL.

1. Togliere la nuova cartuccia dalla confezione.
2. Mescolare il campione capovolgendo cinque volte la provetta.
3. Aprire il coperchio della cartuccia. Adoperando una pipetta di trasferimento pulita da 300 µL (fornita), trasferire 300 µL di campione nella camera "S" della cartuccia.
4. Aggiungere il reagente legante 1 nella camera della cartuccia 1. Spremere la fiala fino ad aggiungere tutto il contenuto alla cartuccia.
5. Chiudere il coperchio della cartuccia.

Limitazioni

- Le prestazioni del saggio Xpert Flu sono state convalidate solo tramite le procedure fornite in questo foglio illustrativo. Eventuali modifiche apportate a queste procedure possono alterare le prestazioni dell'analisi.
- I risultati del saggio Xpert Flu devono essere interpretati contestualmente agli altri dati clinici e di laboratorio a disposizione del medico.
- L'analisi potrebbe produrre risultati errati a causa di raccolta non corretta del campione, errata esecuzione della procedura indicata per la raccolta del campione, errata manipolazione o conservazione, errori tecnici, confusione di campioni o presenza nel campione di un numero di organismi inferiore alla soglia di sensibilità dell'analisi. Per evitare risultati errati, attenersi scrupolosamente alle istruzioni riportate in questo foglio illustrativo.
- Campioni molto viscosi, a seguito dell'aggiunta di mucina all'1,5% (p/v) e al 2,5% (p/v), hanno prodotto risultati dell'analisi falsi negativi con il saggio Xpert Flu. È stata riscontrata l'inibizione del saggio Xpert Flu anche a seguito dell'aggiunta di mucina all'1% (p/v), che ha determinato un ritardo nel rilevamento dell'Influenza A, del sottotipo dell'Influenza A H1N1 2009 e dell'Influenza B.

Caratteristiche delle prestazioni

Prestazioni cliniche

Le caratteristiche delle prestazioni del saggio Xpert Flu in campioni archiviati sono state valutate in due istituti statunitensi.

I soggetti comprendevano individui la cui terapia di routine prevedeva il prelievo di campioni di aspirati/lavaggi nasali o tamponi nasofaringei per l'analisi dell'influenza. Per i soggetti idonei sono state ottenute aliquote di campione rimasto per analisi con saggio Xpert Flu e analisi di riferimento.

Le prestazioni del saggio Xpert Flu sono state calcolate in relazione ai risultati di riferimento, ossia coltura virale seguita da mediante DFA (Direct Fluorescence Assay) con conferma del sequenziamento di tutti i campioni positivi all'Influenza A, per campioni in cui la coltura virale era stata eseguita prima del congelamento. Nei campioni in cui non era stata eseguita la coltura virale prima del congelamento, le prestazioni del saggio Xpert Flu sono state determinate in relazione al saggio Prodesse ProFlu+™ e al sequenziamento. Tutti i campioni positivi all'Influenza A identificati tramite coltura virale o saggio ProFlu+ sono stati sequenziati per distinguere l'Influenza A H1N1 2009 da altri sottotipi di Influenza A.

Risultati complessivi

Sono stati analizzati in totale 270 campioni di tamponi nasofaringei archiviati per l'Influenza A, il sottotipo H1N1 2009 dell'Influenza A e l'Influenza B tramite saggio Xpert Flu e coltura. Sono stati analizzati in totale 357 campioni di aspirati/lavaggi nasali archiviati per l'Influenza A, il sottotipo H1N1 2009 dell'Influenza A e l'Influenza B tramite saggio Xpert Flu e ProFlu+. Tutti i campioni positivi all'Influenza A identificati tramite coltura virale o saggio ProFlu+ erano stati sequenziati per distinguere l'Influenza A H1N1 2009 da altri sottotipi di Influenza A.

Con i tamponi nasofaringei, il saggio Xpert Flu ha dimostrato una sensibilità e una specificità per il rilevamento dell'Influenza A rispettivamente del 97,5% e del 100%, in relazione alla coltura virale più DFA, con conferma della sequenza di tutti gli isolati positivi dell'Influenza A (Tabella 1). La sensibilità e la specificità del saggio Xpert Flu per il sottotipo H1N1 2009 dell'Influenza A con tamponi nasofaringei sono risultate entrambe pari al 100% (Tabella 2). La sensibilità e la specificità del saggio Xpert Flu per l'Influenza B con tamponi nasofaringei sono state rispettivamente del 93,8% e del 99,6% (Tabella 3).

Tabella 1. Prestazioni del saggio Xpert Flu rispetto al metodo di riferimento con tamponi nasofaringei – Influenza A

		Coltura virale + DFA		
		Pos	**Neg**	**Tot**
Saggio Xpert Flu	**Pos**	115	0	115
	Neg	3	152	155
	Tot	118	152	270
		Sensibilità	97,5% (95% CI: 92,8-99,5)	
		Specificità	100% (95% CI: 97,6-100)	
		Precisione	98,9% (95% CI: 96,8-99,8)	
		PPV	100% (95% CI: 96,8-100)	
		NPV	98,1% (95% CI: 94,5-99,6)	

Tabella 2. Prestazioni del saggio Xpert Flu rispetto al metodo di riferimento con tamponi nasofaringei – H1N1 2009

		Coltura virale + DFA/Sequenziamento		
		Pos	**Neg**	**Tot**
Saggio Xpert Flu	**Pos**	85	0	85
	Neg	0	182	182
	Tot	85	182	267
		Sensibilità	100% (95% CI: 95,6-100)	
		Specificità	100% (95% CI: 98,0-100)	
		Precisione	100% (95% CI: 98,6-100)	
		PPV	100% (95% CI: 95,6-100)	
		NPV	100% (95% CI: 98,0-100)	

Tabella 3. Prestazioni del saggio Xpert Flu rispetto al metodo di riferimento con tamponi nasofaringei – Influenza B

Saggio Xpert Flu	Coltura virale + DFA			
		Pos	Neg	Tot
	Pos	30	1	31
	Neg	2	237	239
	Tot	32	238	270
			Sensibilità	93,8% (95% CI: 79,2-99,2)
			Specificità	99,6% (95% CI: 97,7-100)
			Precisione	98,9% (95% CI: 96,8-99,8)
			PPV	96,8% (95% CI: 83,3-99,9)
			NPV	99,2% (95% CI: 97,0-99,9)

In relazione al saggio ProFlu+ con conferma della sequenza di tutti gli isolati positivi all'Influenza A, il saggio Xpert Flu ha consentito di identificare il 99,2% dei campioni positivi di aspirati/lavaggi nasali per l'Influenza A e il 100% dei campioni negativi per l'Influenza A (Tabella 4). Il saggio Xpert Flu consentito di identificare il 97,9% dei campioni positivi di aspirati/lavaggi nasali per il sottotipo H1N1 2009 dell'Influenza A e il 100% dei campioni negativi per il sottotipo H1N1 2009 dell'Influenza A (Tabella 5). Il saggio Xpert Flu ha consentito di identificare il 100% dei campioni positivi di aspirati/lavaggi nasali per l'Influenza B e il 100% dei campioni negativi per l'Influenza B (Tabella 6).

Tabella 4. Prestazioni del pannello Xpert Flu A rispetto al metodo di riferimento con campione di aspirati/lavaggi nasali – Influenza A

Saggio Xpert Flu	ProFlu+			
		Pos	Neg	Tot
	Pos	125	0	125
	Neg	1	231	232
	Tot	126	231	357
			Sensibilità	99,2% (95% CI: 95,7-100)
			Specificità	100% (95% CI: 98,4-100)
			Precisione	99,7% (95% CI: 98,5-100)
			PPV	100% (95% CI: 97,1-100)
			NPV	99,6% (95% CI: 97,6-100)

Tabella 5. Prestazioni del pannello Xpert Flu A rispetto al metodo di riferimento con campione di aspirati/lavaggi nasali – H1N1 2009

Saggio Xpert Flu	ProFlu+/Sequenziamento			
		Pos	**Neg**	**Tot**
	Pos	94	0	94
	Neg	2	261	263
	Tot	96	261	357
		Sensibilità	97,9% (95% CI: 92,7-99,8)	
		Specificità	100% (95% CI:98,6-100)	
		Precisione	99,4% (95% CI: 98,0-99,9)	
		PPV	100% (95% CI: 96,1-100)	
		NPV	99,2% (95% CI: 98,6-100)	

Tabella 6. Prestazioni del pannello Xpert Flu A rispetto al metodo di riferimento con campione di aspirati/lavaggi nasali – Influenza B

Saggio Xpert Flu	ProFlu+			
		Pos	**Neg**	**Tot**
	Pos	40	0	40
	Neg	0	317	317
	Tot	40	317	357
		Sensibilità	100% (95% CI: 91,2-100)	
		Specificità	100% (95% CI: 98,8-100)	
		Precisione	100% (95% CI: 99,0-100)	
		PPV	100% (95% CI: 91,2-100)	
		NPV	100% (95% CI: 98,8-100)	

Per i saggi Xpert Flu eseguiti su campioni di tamponi nasofaringei idonei, il trattamento ha avuto esito positivo al primo tentativo nel 98,9% di tali campioni (267 su 270). I 3 campioni rimanenti hanno fornito risultati indeterminati al primo tentativo (1 risultato non valido e 2 errori). Al secondo tentativo, tutti e tre i campioni hanno fornito un risultato. Per i saggi Xpert Flu eseguiti su campioni di aspirati/lavaggi nasali idonei, il trattamento ha avuto esito positivo al primo tentativo nel 95,5% dei campioni (342 su 358). I 16 campioni rimanenti hanno fornito risultati incerti al primo tentativo (4 non validi, 11 errori e 1 senza risultato). Al secondo tentativo, 15 dei 16 campioni hanno fornito un risultato.

Prestazioni analitiche

Sensibilità analitica (limite di rilevamento)

Sono stati eseguiti studi per determinare gli intervalli di confidenza del 95% per il limite di rilevamento (LoD) analitico di 2 ceppi di Influenza A (H1N1) stagionale, 2 ceppi di Influenza A (H3N2), 5 ceppi di Influenza A H1N1 2009 e 2 ceppi di Influenza B diluiti in una matrice nasofaringea surrogata. La matrice surrogata era costituita da sangue umano all'1%, mucina al 2,5% e cloruro di sodio allo 0,85%. Il limite di rilevamento è definito come la concentrazione più bassa (dose infetta in coltura tissutale, o TCID, di $_{50}$/mL) per campione che è possibile distinguere in maniera riproducibile da campioni negativi con intervallo di confidenza del 95% oppure la concentrazione più bassa alla quale 19 su 20 repliche risultano positive. Ogni ceppo è stato analizzato in repliche di 20 per concentrazione di virus.

La stima e gli intervalli di confidenza sono stati determinati tramite regressione logistica con dati (numero di risultati positivi per numero di repliche a ogni livello) riferiti a tutta la gamma di concentrazioni analizzate. Gli intervalli di confidenza sono stati determinati tramite stime di probabilità sui parametri di modelli logistici con matrice varianza-covarianza. Le stime del punto LoD e gli intervalli di confidenza del 95% superiore e inferiore per ogni ceppo analizzato sono riepilogati nelle tabelle 7-10.

Tabella 7. Intervalli di confidenza del 95% per LoD analitico – Influenza A stagionale H1N1

ID ceppo – Influenza A H1N1	CI 95% inferiore	LoD ($TCID_{50}$/mL)	95% CI superiore
Influenza A/H1/Brisbane/59/07	1,0	1,3	1,9
Influenza A/H1/Nuova Caledonia/20/1999	5,9	7,3	11,7

Tabella 8. Intervalli di confidenza del 95% per LoD analitico – Influenza A stagionale H3N2

ID ceppo – Influenza A H3N2	CI 95% inferiore	LoD ($TCID_{50}$/mL)	95% CI superiore
Influenza A/H3/Brisbane/10/07	2,1	2,5	3,3
Influenza A/H3/Wisconsin/67/05	5,0	5,9	7,9

Tabella 9. Intervalli di confidenza del 95% per LoD analitico – Influenza A H1N1 2009

ID ceppo – H1N1 2009	CI 95% inferiore	LoD ($TCID_{50}$/mL)	95% CI superiore
Influenza A/SuinaNY/01/2009	1,1	1,4	2,1
Influenza A/SuinaNY/02/2009	4,0	4,8	7,3
Influenza A/SuinaNY/03/2009	3,3	3,5	4,1
Influenza A/Canada/6294	66,3	77,1	105,4
Influenza A/WI/629-S1/2009	15,0	16,2	19,1

Tabella 10. Intervalli di confidenza del 95% per LoD analitico - Influenza B

ID ceppo – Influenza A H1N1	CI 95% inferiore	LoD ($TCID_{50}$/mL)	95% CI superiore
Influenza B/Florida/02/06	1,2	1,5	2,2
Influenza B/Florida/07/04	41,3	50,6	72,9

Specificità analitica (reattività crociata)

La specificità analitica del saggio Xpert Flu è stata valutata analizzando un pannello di 40 colture costituite da 18 ceppi virali, 21 ceppi batterici e 1 ceppo di lievito che rappresentano i patogeni respiratori comuni o quelli potenzialmente rilevati nel tratto nasofaringeo. Sono state analizzate tre repliche di tutti i ceppi batterici e di lievito a concentrazioni di $\geq 10^6$ CFU/mL. Sono state analizzate tre repliche di tutti i virus a concentrazioni di $\geq 10^4$ $TCID_{50}$/mL. Nello studio sono stati inclusi controlli positivi e negativi. La specificità analitica è stata pari al 100%. I risultati sono riportati nella Tabella 11.

Tabella 11. Specificità analitica del saggio Xpert Flu

Ceppo	Concentrazione (per cartuccia)	Influenza A	Influenza A H1N1 2009	Influenza B
Controllo positivo 1 – Influenza A/Influenza B	Non applicabile	+	-	+
Controllo positivo 2 – Influenza A H1N1 2009	Non applicabile	+	+	-
Controllo negativo	Non applicabile	-	-	-
Adenovirus tipo 7A	1×10^6 $TCID_{50}$/mL	-	-	-
Adenovirus tipo 1	1×10^6 $TCID_{50}$/mL	-	-	-
Coronavirus umano 229E	1×10^6 $TCID_{50}$/mL	-	-	-
Coronavirus umano OC43	1×10^4 $TCID_{50}$/mL	-	-	-
Citomegalovirus*	1×10^5 Copie/mL	-	-	-
Enterovirus tipo 71	1×10^6 $TCID_{50}$/mL	-	-	-
Virus di Epstein-Barr	1×10^5 $TCID_{50}$/mL	-	-	-
Parainfluenzavirus tipo 1	1×10^5 $TCID_{50}$/mL	-	-	-
Parainfluenzavirus tipo 2	1×10^6 $TCID_{50}$/mL	-	-	-
Parainfluenzavirus tipo 3	1×10^6 $TCID_{50}$/mL	-	-	-
Virus del morbillo	1×10^6 $TCID_{50}$/mL	-	-	-
Metapneumovirus umano	1×10^6 $TCID_{50}$/mL	-	-	-
Virus della parotite	1×10^6 $TCID_{50}$/mL	-	-	-
Virus respiratorio sinciziale A	1×10^6 $TCID_{50}$/mL	-	-	-
Virus respiratorio sinciziale B	1×10^6 $TCID_{50}$/mL	-	-	-
Virus dell'herpes simplex umano tipo 1	1×10^6 $TCID_{50}$/mL	-	-	-
Rinovirus umano tipo 4	1×10^6 $TCID_{50}$/mL	-	-	-
Echovirus 11	1×10^6 $TCID_{50}$/mL	-	-	-
*Bordetella pertussis**	1×10^6 Copie/mL	-	-	-
Chlamydia pneumoniae	1×10^6 CFU/mL	-	-	-
Corynebacterium xerosis	1×10^6 CFU/mL	-	-	-
Escherichia coli	1×10^6 CFU/mL	-	-	-
Proteus vulgaris	1×10^6 CFU/mL	-	-	-
Proteus mirabilis	1×10^6 CFU/mL	-	-	-
Klebsiella pneumoniae	1×10^6 CFU/mL	-	-	-
Haemophilus influenzae	1×10^6 Copie/mL	-	-	-
Lactobacillus crispatus	1×10^6 CFU/mL	-	-	-
Legionella pneumophila	1×10^6 CFU/mL	-	-	-
Moraxella catarrhalis	1×10^6 CFU/mL	-	-	-
Mycobacterium tuberculosis (ceppo BCG)	1×10^6 CFU/mL	-	-	-
Mycoplasma pneumoniae	1×10^6 CFU/mL	-	-	-
Neisseria meningitides	1×10^6 CFU/mL	-	-	-
Neisseria Cinneria	1×10^6 CFU/mL	-	-	-
Pseudomonas aeruginosa	1×10^6 CFU/mL	-	-	-
Staphylococcus aureus	1×10^6 CFU/mL	-	-	-
Staphylococcus epidermidis	1×10^6 CFU/mL	-	-	-
Streptococcus pneumoniae	1×10^6 CFU/mL	-	-	-
Streptococcus pyogenes	1×10^6 CFU/mL	-	-	-
Streptococcus salivarius	1×10^6 CFU/mL	-	-	-
Candida albicans	1×10^6 CFU/mL	-	-	-

*Per Citomegalovirus e Bordetella pertussis è stato analizzato l'acido nucleico.

Reattività analitica (inclusività)

La reattività analitica del saggio Xpert Flu è stata valutata per più ceppi di Influenza A (sottotipi H1N1, H3N2, H5N2, H5N1 e H7N3), Influenza A H1N1 2009 e Influenza B, tra cui il sottotipo H1N1 dell'Influenza A (12 ceppi), il sottotipo H3N2 dell'Influenza A (7 ceppi), il sottotipo H1N1 2009 dell'Influenza A (6 ceppi), il sottotipo H5N1 dell'Influenza A (1 ceppi), il sottotipo H5N2 dell'Influenza A (1 ceppi), il sottotipo H7N3 dell'Influenza A (1 ceppo) e l'Influenza B (11 ceppi). Sono state analizzate tre repliche di ogni ceppo virale a 5-500 $TCID_{50}$/mL. I risultati sono riportati nella Tabella 12.

Tabella 12. Reattività analitica (inclusività) del saggio Xpert Flu

Ceppo virale	Concentrazione ($TCID_{50}$/mL)	Influenza A	Influenza A H1N1 2009	Influenza B
Influenza A/Denver/1/57 (H1N1)	500	+	-	-
Influenza A/New York/55/2004 (H1N1)	500	+	-	-
Influenza A/Mal/302/54 (H1N1)	50	+	-	-
Influenza A/New Jersey/8/76 (H1N1)	500	+	-	-
Influenza A/NWS/33 (H1N1)	5	+	-	-
Influenza A/PR/8/34 (H1N1)	500	+	-	-
Influenza A/Taiwan/42/06 (H1N1)	500	+	-	-
Influenza A/WS/33 (H1N1)	5	+	-	-
Influenza A/Suina/1976/31 (H1N1 suina)	500*	+	-	-
Influenza A/Suina/Iowa/15/30 (H1N1 suina)	500*	+	-	-
Influenza A/Brisbane/59/07 (H1N1)	5	+	-	-
Influenza A/Nuova Caledonia/20/1999 (H1N1)	50	+	-	-
Influenza A/Victoria/3/75 (H3N2)	500	+	-	-
Influenza A/Aichi2/68 (H3N2)	500	+	-	-
Influenza A/Hong Kong/8/68 (H3N2)	50	+	-	-
Influenza A/Hawaii/15/2001 (H3N2)	500	+	-	-
Influenza A/Port Chalmers/1/73 (H3N2)	500	+	-	-
Influenza A/Brisbane/10/07 (H3N2)	10	+	-	-
Influenza A/Wisconsin/67/05 (H3N2)	10	+	-	-
Influenza A/SuinaNY/01/2009 (H1N1 09)	10	+	+	-
Influenza A/SuinaNY/02/2009 (H1N1 09)	100	+	+	-
Influenza A/SuinaNY/03/2009 (H1N1 09)	10	+	+	-
Influenza A/California/4/2009 (H1N1 09)	5	+	+	-
Influenza A/Canada/6294 (H1N1 09)	500	+	+	-
Influenza A/WI/929-S1 (H1N1 09)	100	+	+	-
Influenza A/Anatra selvatica/WI/34/75 (H5N2)	3 pg/µL^^	+	-	-
Influenza A/Anhui/02/2005/PR8-IBCDC-RG5 (H5N1)	0,122 pg/µL^^	+	-	-
Influenza A/Polli/NJ/15086-3/94 (H7N3)	5 pg/µL^^	+	-	-
Influenza B/Allen/45	500	-	-	+
Influenza B/Florida/02/06	10	-	-	+
Influenza B/Florida/04/06	500	-	-	+
Influenza B/Florida/07/04	50	-	-	+
Influenza B/GL/1739/54	500	-	-	+
Influenza B/Hong Kong/5/72	500	-	-	+
Influenza B/Lee/40	500	-	-	+
Influenza B/Malesia/2506/04	500	-	-	+
Influenza B/Maryland/1/59	500	-	-	+
Influenza B/Panama/45/90	500	-	-	+
Influenza B/Taiwan/2/62	50^	-	-	+

* Concentrazione espressa in PFU/ml; ^concentrazione espressa in CEID50/ml; ^^concentrazione espressa in picogrammi/µL.

Studio sulle sostanze interferenti

In uno studio non clinico, le sostanze potenzialmente interferenti che possono essere presenti nel tratto nasofaringeo sono state valutate direttamente in relazione alle prestazioni del saggio Xpert Flu. Le sostanze esogene potenzialmente interferenti nel tratto nasofaringeo possono includere tra l'altro: sangue, muco o secrezioni nasali e farmaci per naso e gola utilizzati per alleviare congestione, secchezza nasale, irritazione o sintomi di asma e allergia. Queste sostanze solo elencate nella Tabella 13 insieme alle concentrazioni e gli ingredienti attivi analizzati. Campioni molto viscosi, a seguito dell'aggiunta di mucina all'1,5% (p/v) e al 2,5% (p/v), hanno prodotto risultati dell'analisi falsi negativi con il saggio Xpert Flu. È stata riscontrata l'inibizioine del saggio Xpert Flu anche a seguito dell'aggiunta di mucina all'1% (p/v), che ha determinato un ritardo nel rilevamento dell'Influenza A, del sottotipo dell'Influenza A H1N1 2009 e dell'Influenza B.

Tabella 13. Sostanze potenzialmente interferenti nel saggio Xpert Flu

Sostanza	Descrizione/Ingrediente attivo	Concentrazione analizzata
Sangue (umano)	Non applicabile	2% (v/v)
Mucina	Proteina mucina purificata (ghiandola submandibolare bovina o suina)	2,5%, 1,5%, 1% e 0,5% (p/v)
Gocce nasali Neo-Synephrine®	Fenilefrina cloridrato	15% (v/v)
Spray nasale Anefrin	Oximetazolina cloridrato	15% (v/v)
Gel nasale Zicam®	Luffa opperculata, Galphimia glauca, Histaminum hydrochloricum Sulfur	5% (v/v)
Spray nasale salino	Cloruro di sodio con preservanti	15% (v/v)
Unguento nasale antibiotico	Mupirocina	10 mg/ml
Antibatterico sistemico	Tobramicina	4,0 µg/ml
Pasticche per la gola, analgesico e anestetico orale	Mentolo	1,7 mg/ml di mentolo

Studio di contaminazione da carry-over

È stato condotto uno studio per dimostrare che le cartucce GeneXpert monouso indipendenti impediscono la contaminazione da carry-over in campioni negativi trattati dopo campioni con livello di positività molto elevato nello stesso modulo GeneXpert. Nello studio, nello stesso modulo GeneXpert è stato trattato un campione negativo subito dopo un campione con livello di positività molto elevato all'Influenza A H1N1 2009 (circa 10^6 $TCID_{50}$/analisi) o all'Influenza B (circa 10^6 $TCID_{50}$/analisi). Questo schema di analisi è stato ripetuto 20 volte in 4 moduli GeneXpert per un totale di 88 trattamenti, che hanno prodotto 40 campioni positivi e 48 campioni negativi. Tutti i 40 campioni positivi sono stati segnalati correttamente come positivi all'Influenza A H1N1 2009 o all'Influenza B. Tutti i 48 campioni negativi sono stati segnalati correttamente come negativi all'Influenza A, H1N1 2009 non rilevata e negativi all'Influenza B.

Riproducibilità

Un pannello di 10 campioni con concentrazioni variabili di Influenza A, Influenza B e sottotipo H1N1 2009 dell'Influenza A sono stati analizzati in duplicato in 10 giorni diversi in ognuno dei tre siti (10 campioni × 2 volte al giorno × 10 giorni × 3 siti). In ognuno dei tre siti di analisi è stato utilizzato un lotto del saggio Xpert Flu. I saggi Xpert Flu sono stati eseguiti in base alla procedura del saggio Xpert Flu. I risultati sono riepilogati nella Tabella 14.

Tabella 14. Riepilogo dei risultati della riproducibilità[a]

ID campione	Sito 1	Sito 2	Sito 4	% di concordanza totale per campione
Negativo	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (60/60)
Influenza A moderato positivo	100% (20/20)	100% (19/19)[b]	100% (20/20)	100% (59/59)
Influenza A basso positivo	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (60/60)
Influenza A alto negativo	100% (20/20)	95,0% (19/20)	90% (18/20)	95,0% (57/60)
H1N1 2009 moderato positivo	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (60/60)
H1N1 2009 basso positivo	100% (20/20)	100% (19/19)[a]	100% (20/20)	100% (59/59)
H1N1 2009 alto negativo	94,7% (18/19)[b]	100% (20/20)	89,5% (17/19)[b]	94,8% (55/58)[c]
Influenza B moderato positivo	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (60/60)
Influenza B basso positivo	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (60/60)
Influenza B alto negativo	90,0% (18/20)	95,0% (19/20)	55,0% (11/20)	80,0% (48/60)
% concordanza totale	98,5% (196/199)	99,0% (196/198)	93,5% (186/199)	97,0% (578/596)

[a] n=19 poiché un campione era indeterminato e non è stato rianalizzato.
[b] n=19 a causa della ripetizione di un risultato indeterminato ottenuto.
[c] 9 campioni negativi su 55 per H1N1 2009 hanno prodotto una chiamata positiva valida di Influenza A, in quanto era stato rilevato il segno dell'Influenza A. Una chiamata positiva valida di H1N1 2009 richiede il rilevamento di entrambi i segni di Influenza A e H1N1 2009.

Riferimenti bibliografici

1. Petric M, Comanor L, Petti CA. Role of the laboratory in diagnosis of influenza during seasonal epidemics and potential pandemics. J Infect Dis. 2006; 194:S98-110.

2. Schweiger B, Zadow I, Heckler R, et al. Application of a fluorogenic PCR assay for typing and subtyping of influenza viruses in respiratory samples. J Clin Micro. 2000; 38:1552-1558.

3. http://www.cdc.gov, accesso del 22 febbraio 2010.

4. Centers for Disease Control and Prevention. Biosafety in Microbiological and Biomedical laboratories. Richmond JY and McKinney RW (eds) (1993). numero pubblicazione HHS (CDC) 93-8395.

5. Interim Biosafety Guidance for All Individuals Handling Clinical Specimens or Isolates Containing 2009-H1N1 Influenza A Virus (Novel H1N1), including Vaccine Strains, 15 agosto 2009 (http://www.cdc.gov/h1n1flu/guidelines_labworkers.htm).

6. Clinical and Laboratory Standards Institute (ex National Committee for Clinical Laboratory Standards). Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline. Documento M29 (fare riferimento all'ultima edizione).

Assistenza

Per richiedere assistenza, contattare Cepheid a uno dei recapiti indicati di seguito. Quando si contatta l'Assistenza tramite telefono o posta elettronica, è necessario fornire il numero di serie dello strumento e l'ID lotto reagente.

Nord America

Per l'assistenza tecnica, utilizzare i seguenti recapiti:

Tel: +1.888.838.3222

E-mail: techsupport@cepheid.com

È possibile telefonare all'Assistenza tecnica Cepheid dal lunedì al venerdì, dalle 5 alle 17 (fuso orario della Costa del Pacifico).

Unione Europea

Per l'assistenza tecnica, utilizzare i seguenti recapiti:

Tel: +33.563.82.53.19

Fax: +33.563.82.53.01

E-mail: techsupport@cepheideurope.fr

Altri paesi

Rivolgersi al rappresentante Cepheid di zona.

Tabella dei simboli

Tabella 15. Significato dei simboli

Simbolo	Significato
REF	Numero di catalogo
IVD	Dispositivo medico per diagnostica *in vitro*
	Non riutilizzare
	Produttore
Σ	Contiene una quantità sufficiente per <n> analisi
CONTROL	Controllo
EC REP	Rappresentante autorizzato nella Comunità Europea
+2 +28 °C	Limiti di temperatura
	Rischio biologico

Produttore

Cepheid
904 Caribbean Drive
Sunnyvale, CA 94089-1189

Telefono: +1.408.541.4191
Fax: +1.408.541.4192

EC REP Rappresentante autorizzato

Cepheid Europa
Vira-Solelh
81470 Maurens-Scopont
Francia

Tel: +33.563.82.53.00
Fax: +33.563.82.53.01
E-mail: cepheid@cepheideurope.fr

CE IVD

Português

Apenas para utilização em diagnóstico *in vitro*

Nome patenteado

Xpert® Flu

Nome comum ou usual

Ensaio Xpert Flu

Utilização prevista

O Ensaio Xpert Flu da Cepheid® é um ensaio de RT-PCR automatizado, multiplex em tempo real, destinado à detecção qualitativa e diferenciação *in vitro* do Influenza A, Influenza B e RNA viral do influenza H1N1 2009. O Ensaio Xpert Flu utiliza amostras de aspirados/lavagens nasais e zaragatoas nasofaríngeas, recolhidas de pacientes com sinais e sintomas de infecção respiratória em conjunto com factores de risco clínicos e epidemiológicos. O Ensaio Xpert Flu destina-se a auxiliar no diagnóstico do influenza.

Resumo e explicação

O influenza, ou gripe, é uma infecção viral, contagiosa, do tracto respiratório, que ocorre frequentemente no Inverno. A transmissão do influenza ocorre principalmente através do ar (p. ex.: tosse ou espirros). Os sintomas comuns incluem febre, arrepios, dor de cabeça, mal-estar, tosse e congestão dos seios nasais. Poderão ocorrer também sintomas gastrointestinais (p. ex.: náuseas, vómitos ou diarreia), principalmente em crianças, embora sejam menos comuns. De um modo geral, os sintomas aparecem dois dias após a exposição a um indivíduo infectado. Poderá desenvolver-se um quadro de penumonia como uma complicação após a infecção pelo influenza, causando morbidade e mortalidade acrescidas em crianças, pessoas de idade e em populações imunocomprometidas.[1,2]

Os vírus Influenza são classificados segundo os tipos A, B e C e os dois primeiros são os que mais causam infecções nos seres humanos. O Influenza A é o tipo mais comum do vírus influenza nos seres humanos, e é geralmente responsável pelas epidemias de gripe sazonal podendo, potencialmente, provocar pandemias. Os vírus Influenza A também podem afectar animais como, por exemplo, pássaros, porcos e cavalos. As infecções pelo vírus Influenza B restringem-se, de um modo geral, aos seres humanos, sendo mais raro provocarem epidemias. Os vírus Influenza A dividem-se ainda em subtipos, com base em duas proteínas de superfície: hemaglutinina (H) e neuraminidase (N). A gripe sazonal é normalmente causada por combinações dos subtipos H1, H2, H3, N1 e N2. Para além dos vírus da gripe sazonal que já circulam no ar, uma nova estirpe de H1N1 foi identificada em seres humanos, no início de 2009.[3]

Os programas de vigilância activa em conjunto com precauções de controlo da infecção são componentes importantes na prevenção da transmissão do Influenza. A utilização de ensaios capazes de fornecer resultados rápidos na identificação e diferenciação do agente infeccioso em pacientes infectados com a gripe sazonal e com a nova gripe H1N1 2009 é também um factor importante para um controlo eficaz, selecção adequada do tratamento e prevenção de surtos disseminados de gripe.

Princípio do procedimento

O Ensaio Xpert Flu é um teste de diagnóstico rápido, automatizado, realizado *in vitro* para a detecção qualitativa do Influenza A, Influenza B e do subtipo do Influenza A, o H1N1 2009. O ensaio é executado nos sistemas GeneXpert® Dx da Cepheid.

Os sistemas GeneXpert Dx automatizam e integram a purificação das amostras, a amplificação dos ácidos nucleicos e a detecção das sequências-alvo em amostras simples ou complexas, utilizando ensaios de RT-PCR (transcriptase reversa-PCR) e PCR em tempo real. O sistema é composto por um instrumento, um computador e software pré-instalado para efectuar testes e visualizar os resultados. Os sistemas requerem a utilização de cartuchos descartáveis de utilização única GeneXpert que contêm os reagentes de RT-PCR e PCR e onde decorrem os processos de RT-PCR e PCR. Como os cartuchos são autónomos, a contaminação cruzada entre amostras é minimizada. Para uma descrição completa dos sistemas, consulte o *Manual do utilizador do sistema GeneXpert Dx* apropriado.

O Ensaio Xpert Flu inclui reagentes para a detecção e diferenciação do Influenza A, Influenza B e subtipo do Influenza A, o H1N1 2009 directamente através de amostras de aspirados/lavagens nasais (NA/W) e zaragatoas nasofaríngeas (NP) de pacientes com suspeita de gripe. No cartucho estão também incluídos um controlo de processamento da amostra (Sample Processing Control, SPC) e um controlo de verificação da sonda (Probe Check Control, PCC). O SPC está presente para controlo do processamento adequado dos vírus-alvo e para monitorizar a presença de inibidores na reacção de PCR. O controlo de verificação da sonda (PCC, Probe Check Control) verifica a reidratação dos reagentes, o enchimento do tubo de PCR no cartucho, a integridade da sonda e a estabilidade do corante.

Reagentes e instrumentos

Material fornecido

Σ O kit do Ensaio Xpert Flu contém reagentes suficientes para processar 10 amostras biológicas ou amostras de controlo de qualidade. O kit contém o seguinte:

- **Cartuchos de Ensaio Xpert Flu com tubos de reacção integrados** — **10**
- **Esfera 1 (liofilizada)** — **1 por cartucho**
  - Enzima de transcriptase reversa
  - Enzima de taq polimerase
  - dNTPs
  - Sonda
  - BSA (albumina sérica bovina)
  - Sais
- **Esfera 2 (liofilizada)** — **1 por cartucho**
  - Primers
  - Sondas
  - dNTPs
  - BSA (albumina sérica bovina)
  - Sais
- **Esfera 3 (liofilizada)** — **1 por cartucho**
  - Controlo da preparação de amostras não infecciosas de controlo de processamento de amostras (SPC) Armored RNA®
- **Reagente de lise** — **2,0 ml por cartucho**
  - Hidrocloreto de guanidina e tensioactivos
- **Reagente de lavagem** — **0,5 ml por cartucho**
  - PEG, Monotioglicerol, KCl, tampão Tris, EDTA, tensioactivos, azida de sódio
- **Reagente de eluição** — **2,0 ml por cartucho**
  - Tampão Tris-EDTA, Tween 20
- Σ **Bolsa de reagente para Ensaio Xpert Flu** — **1 por kit**
- **Reagente de fixação** — **10 x 1 ml por ampola**
  - água, etanol
- **Pipetas de transferência descartáveis de 300 µl** — **2 bolsas de 12 por kit**
- **CD** — **1 por kit**
  - Ficheiro de definições do ensaio (ADF, Assay Definition File)
  - Instruções para importar o ficheiro ADF para o software GX
  - Folheto da embalagem

Notas:

- As Fichas de Dados de Segurança dos Materiais (Material Safety Data Sheets, MSDS) para todos os reagentes fornecidos com este ensaio encontram-se disponíveis mediante solicitação ao Apoio Técnico da Cepheid ou visitando o site http://www.cepheid.com/tests-and-regeants/literature/msds/.
- A albumina sérica bovina (BSA) deste produto foi produzida exclusivamente a partir de plasma bovino com origem nos EUA. O fabrico da BSA também decorreu nos EUA. Nenhuma proteína de ruminante ou outra proteína animal foi administrada aos animais; os animais foram aprovados em testes ante e post-mortem. Durante o processamento, não houve mistura do material com outros materiais de origem animal.

Conservação e manuseamento

- Conserve os cartuchos e reagentes do Ensaio Xpert Flu a 2 - 28°C.
- Não abra um cartucho até estar pronto para realizar o teste.
- Não utilize quaisquer reagentes que tenham ficado turvos ou descoloridos.
- Não utilize um cartucho que tenha vazado.

Materiais necessários mas não fornecidos

- Sistema GeneXpert Dx (a referência varia com a configuração): instrumento GeneXpert, computador com software patenteado, leitor de códigos de barras e manual do operador.
- Impressora (consulte o *Manual do utilizador do sistema GeneXpert Dx* para obter as orientações de compatibilidade)

Materiais disponíveis mas não fornecidos

- Kit de colheita de amostras nasais, ref.ª NASL-100N-100 da Cepheid.
- Controlos de vírus desactivados da ZeptoMetrix, ref.ª NATFLUA/B-6MC e ref.ª NATFLUAH1N1-MC como controlos positivos externos e ref.ª NATCXVA9-MC (vírus de Coxsackie) como controlo negativo externo.

Advertências e precauções

- Trate todas as amostras biológicas, incluindo os cartuchos usados, como sendo capazes de transmitir agentes infecciosos. Como é muitas vezes impossível saber quais podem ser infecciosas, todas as amostras biológicas devem ser tratadas com precauções universais. As directivas para o manuseamento de amostras estão disponíveis nos Centers for Disease Control and Prevention (CDC)[4,5] e no Clinical and Laboratory Standards Institute (anteriormente, National Committee for Clinical Laboratory Standards) dos EUA[6].
- Cumpra os procedimentos de segurança da sua instituição relativos ao trabalho com produtos químicos e manuseamento de amostras biológicas.
- Não substitua os reagentes do Ensaio Xpert Flu por outros reagentes.
- Não abra a tampa do cartucho do Ensaio Xpert Flu excepto para adicionar amostras e reagentes.
- Não utilize um cartucho que caiu ou que foi agitado depois de ter adicionado a amostra e o reagente.
- Não utilize um cartucho que tenha um tubo de reacção danificado.
- Cada cartucho de Ensaio Xpert Flu de utilização única é utilizado para processar um teste. Não reutilize cartuchos usados.
- Consulte o pessoal responsável pelos resíduos ambientais da sua instituição para obter informações sobre a eliminação adequada dos cartuchos usados e dos reagentes não utilizados. Este material pode apresentar características de resíduos perigosos de acordo com a lei federal “Resource Conservation and Recovery Act" (RCRA – Lei da Recuperação e Conservação dos Recursos) da Associação de Protecção Ambiental (EPA – Environmental Protection Agency) dos EUA e deve cumprir os requisitos específicos sobre eliminação. Consulte os regulamentos locais e estatais, pois estes podem diferir dos regulamentos de eliminação federais. As instituições fora dos EUA devem consultar os requisitos sobre eliminação de resíduos perigosos do respectivo país.
- Conserve o kit do Ensaio Xpert Flu a 2 - 28°C.
- Não abra a embalagem de um cartucho até estar pronto para realizar o teste.

Colheita, transporte e conservação de amostras

Os aspirados/lavagens nasais (NA/W) ou amostras de zaragatoas nasofaríngeas (NP) devem ser recolhidos seguindo os procedimentos normalizados da sua instituição e colocados num meio de transporte universal (tubos de 3 ml UTM - Universal Transport Media).

As amostras devem ser transportadas a uma temperatura de 2 - 8 °C. Antes do processamento, as amostras podem ser conservadas até 72 horas a 2 - 8°C.

Procedimento

Preparação do cartucho

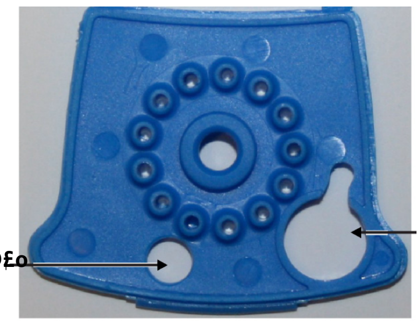
Importante: Inicie o teste nos 60 minutos seguintes à adição da amostra e do reagente ao cartucho.

Para zaragatoas de amostras nasofaríngeas (NP)

1. Retire o cartucho e os reagentes da embalagem.
2. Misture a amostra invertendo o tubo de meio de transporte universal (UTM) cinco vezes.
3. Abra a tampa do cartucho. Utilizando uma pipeta de transferência limpa (fornecida), transfira 300 µl do tubo UTM para a câmara "S" do cartucho.
4. Coloque o reagente de fixação 1 na câmara 1 do cartucho. Esprema a ampola até que o conteúdo inteiro seja adicionado ao cartucho.
5. Feche a tampa do cartucho.

Para amostras de aspirados/lavagens nasais (NA/W)

1. Utilizando uma pipeta de transferência limpa de 300 µl (fornecida), transfira 600 µl de amostra (colocando 300 µl da pipeta duas vezes) para o tubo UTM de 3 ml e, em seguida, coloque a tampa no tubo.
2. Misture a amostra invertendo o tubo cinco vezes.
3. Retire o cartucho e os reagentes da embalagem.
4. Abra a tampa do cartucho. Utilizando uma pipeta de transferência limpa de 300 µl (fornecida), transfira 300 µl da amostra diluída para a câmara "S" do cartucho.
5. Coloque o reagente de fixação 1 na câmara 1 do cartucho. Esprema a ampola até que o conteúdo inteiro seja adicionado ao cartucho.
6. Feche a tampa do cartucho.



Câmara 1 = reagente de fixação 1; Câmara "S" = amostra

Figura 1. Cartucho do Ensaio Xpert Flu (visto de cima)

Início do teste

Importante: Antes de iniciar o teste, certifique-se de que o ficheiro de definições do Ensaio Xpert Flu foi importado para o software. Esta secção enumera os passos básicos para realizar o teste nos sistemas GeneXpert DX. Para obter instruções detalhadas, consulte o *Manual do utilizador do sistema GeneXpert Dx* apropriado.

1. Ligue o computador e, em seguida, ligue o instrumento GeneXpert Dx.
2. No ambiente de trabalho Windows®, faça duplo clique no ícone de atalho do GeneXpert Dx.
3. Inicie sessão no software do sistema GeneXpert Dx utilizando o seu nome de utilizador e palavra-passe.
4. Na janela do sistema GeneXpert Dx, clique em **Create Test** (Criar teste). Surge a caixa de diálogo Scan Cartridge Barcode (Ler código de barras do cartucho).
5. Leia o código de barras do cartucho do Ensaio Xpert Flu. Surge a janela **Create Test** (Criar teste). Utilizando as informações do código de barras, o software vai preencher automaticamente as caixas dos campos seguintes: Select Assay (Seleccionar ensaio), Reagent Lot ID (ID do lote de reagente) e Cartridge SN (N.º série do cartucho).
6. Na caixa **Sample ID** (ID da amostra), leia ou introduza a ID da amostra. Certifique-se de que introduz a ID da amostra correcta. A ID da amostra está associada aos resultados do teste e é apresentada na janela **View Results** (Ver resultados) e em todos os relatórios.
7. Clique em **Start Test** (Iniciar teste). Na caixa de diálogo apresentada, introduza a sua palavra-passe.
8. Abra a porta do módulo do instrumento com a luz verde a piscar e coloque o cartucho.
9. Feche a porta. O teste inicia-se e a luz verde pára de piscar. Quando o teste termina, a luz desliga-se.
10. Antes de abrir a porta do módulo e retirar o cartucho, aguarde até o sistema desbloquear a porta.
11. Elimine os cartuchos usados num contentor adequado para resíduos biológicos, de acordo com as práticas normalizadas da sua instituição.

Visualização e impressão dos resultados

Para obter instruções detalhadas sobre a forma de visualizar e imprimir os resultados, consulte o *Manual do utilizador do sistema GeneXpert Dx*.

CONTROL

Controlo de qualidade

Cada teste inclui um SPC e um PCC.

Controlo de processamento da amostra (SPC) - Assegura que a amostra foi correctamente processada. O SPC é um Armored RNA® sob a forma de uma esfera seca, que é incluído em cada cartucho para verificar o processamento adequado do vírus da amostra. O SPC verifica se ocorreu a lise do vírus Influenza (se o organismo estiver presente) e verifica se o processamento da amostra é adequado. Adicionalmente, este controlo detecta a inibição associada à amostra das reacções RT-PCR e PCR. O SPC deve ser positivo numa amostra negativa e pode ser negativo ou positivo numa amostra positiva. O SPC é aprovado se preencher os critérios de aceitação validados.

Controlo de verificação da sonda (PCC) - Antes do início da reacção de PCR, o sistema GeneXpert Dx mede o sinal de fluorescência das sondas para monitorizar a reidratação das esferas, o enchimento do tubo de reacção, a integridade da sonda e a estabilidade do corante. O PCC é aprovado se preencher os critérios de aceitação validados.

Controlos externos - Os controlos externos devem ser utilizados de acordo com as normas de organismos de acreditação locais, regionais e nacionais, conforme aplicável.

Interpretação dos resultados

Os resultados são interpretados automaticamente pelo sistema GeneXpert Dx a partir dos sinais de fluorescência medidos e dos algoritmos de cálculo incorporados, sendo apresentados de forma clara na janela **View Results** (Ver resultados). Os resultados possíveis são:

Flu A POSITIVE (Positivo para gripe A); 2009 H1N1 NOT DETECTED (H1N1 2009 não detectado); Flu B NEGATIVE (Negativo para gripe B) (Figura 2)

RNA-alvo de gripe A detectado; RNA de H1N1 2009 não detectado; RNA-alvo de gripe B não detectado.

- O alvo da gripe A tem um Ct dentro do intervalo válido e endpoint acima do valor mínimo.
- SPC - NA (não aplicável); o SPC é ignorado dado que a amplificação alvo da gripe A pode competir com este controlo.
- Probe Check - PASS (Verificação da sonda: Aprovada); todos os resultados de verificação da sonda são aprovados.

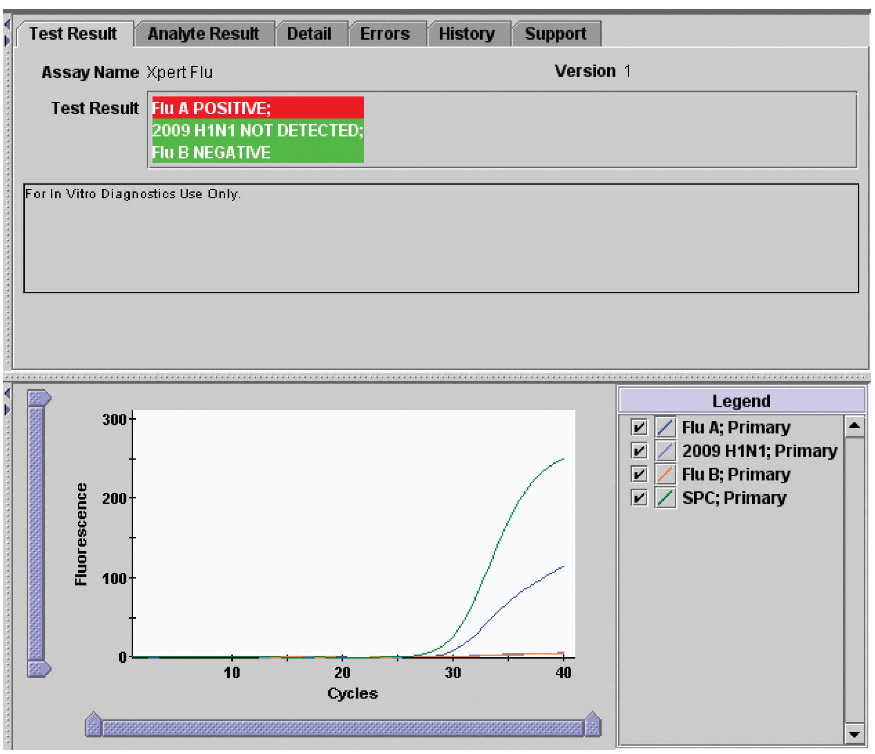


Figura 2. Exemplo de um resultado Flu A positive (Positivo para gripe A)

Flu A POSITIVE (Positivo para gripe A); 2009 H1N1 DETECTED (H1N1 2009 detectado); Flu B NEGATIVE (Negativo para gripe B) (Figura 3)

RNA-alvo de gripe A detectado; RNA-alvo de H1N1 2009 detectado; RNA-alvo de gripe B não detectado.

- O alvo da gripe A tem um Ct dentro do intervalo válido e endpoint acima do valor mínimo.
- O alvo H1N1 2009 tem um Ct dentro do intervalo válido e endpoint acima do valor mínimo.
- SPC - NA (não aplicável); o SPC é ignorado dado que a amplificação alvo da gripe A e do H1N1 2009 pode competir com este controlo.
- Probe Check - PASS (Verificação da sonda: Aprovada); todos os resultados de verificação da sonda são aprovados.

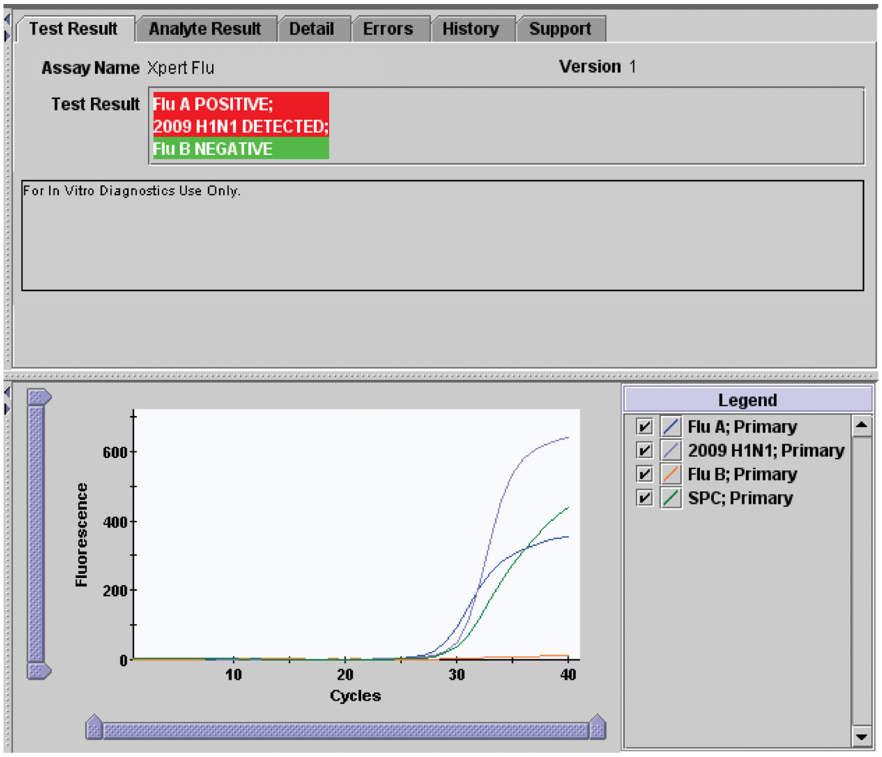


Figura 3. Exemplo de um resultado 2009 H1N1 POSITIVE (H1N1 2009 positivo)

Flu A NEGATIVE (Negativo para gripe A); 2009 H1N1 NOT DETECTED (H1N1 2009 não detectado); Flu B POSITIVE (Positivo para gripe B) (Figura 4)

RNA-alvo de gripe B detectado; RNA-alvo de gripe A não detectado; RNA-alvo de H1N1 2009 não detectado.

- O alvo da gripe B tem um Ct dentro do intervalo válido e endpoint acima do valor mínimo.
- SPC - NA (não aplicável); o SPC é ignorado dado que a amplificação alvo da gripe B pode competir com este controlo.
- Probe Check - PASS (Verificação da sonda: Aprovada); todos os resultados de verificação da sonda são aprovados.

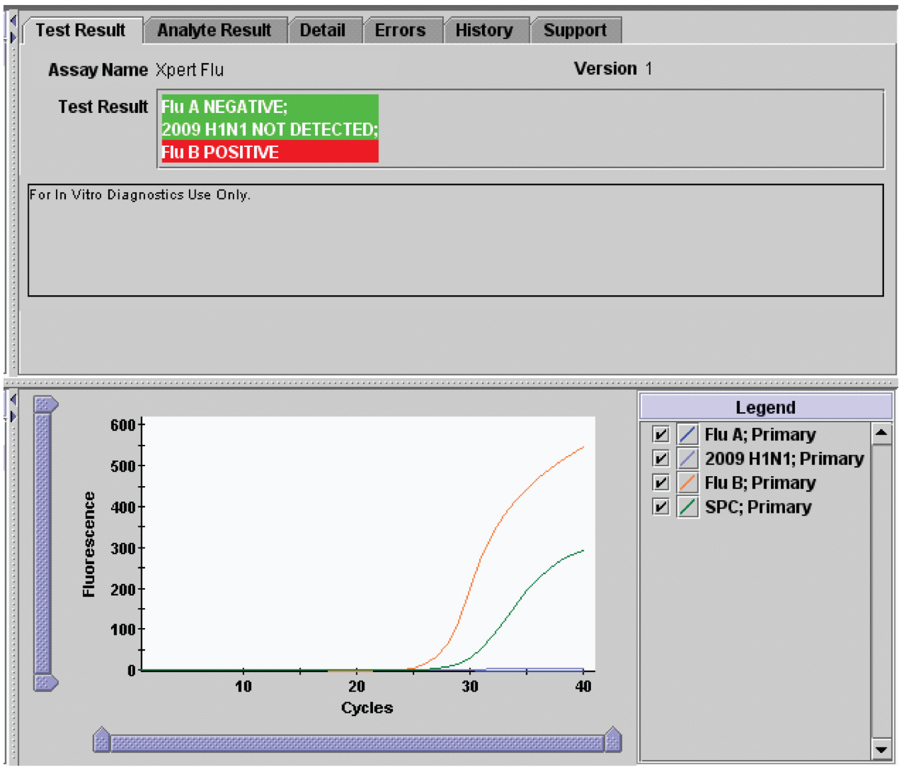


Figura 4. Exemplo de um resultado Flu B POSITIVE (Positivo para gripe B)

Flu A NEGATIVE (Negativo para gripe A); 2009 H1N1 NOT DETECTED (H1N1 2009 não detectado); Flu B NEGATIVE (Negativo para gripe B) (Figura 5)

RNA-alvo de gripe A não detectado; RNA-alvo de H1N1 2009 não detectado e RNA-alvo de gripe B não detectado. O SPC cumpre os critérios de aceitação.

- Não foram detectados RNAs-alvo de gripe A, H1N1 2009 e gripe B.
- SPC - PASS (SPC - Aprovado); o SPC tem um Ct dentro do intervalo válido e um endpoint acima do valor mínimo.
- Probe Check - PASS (Verificação da sonda: Aprovada); todos os resultados de verificação da sonda são aprovados.

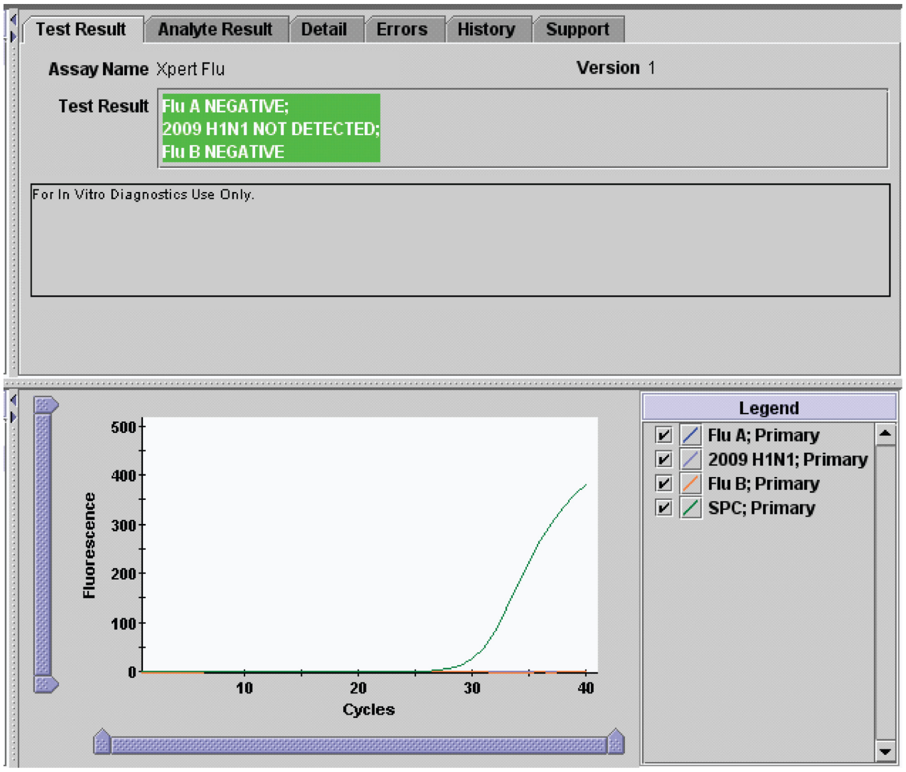


Figura 5. Exemplo de um resultado negativo

INVALID (Inválido) (Figuras 6 e 7)

1. O SPC não cumpre os critérios de aceitação. Não pode ser determinada a presença ou ausência de RNAs-alvo. Repita o teste de acordo com as instruções da secção Procedimento de repetição do teste seguinte.
   - SPC - FAIL (SPC - Não aprovado); o resultado do SPC é negativo, o Ct do SPC não está dentro do intervalo válido e o endpoint está abaixo do valor mínimo.
   - Probe Check - PASS (Verificação da sonda: Aprovada); todos os resultados de verificação da sonda são aprovados.

   ou

2. Não pode ser determinada a presença ou ausência do RNA-alvo do H1N1 2009. Repita o teste de acordo com as instruções da secção Procedimento de repetição do teste seguinte.
   - RNA-alvo da gripe A não detectado e RNA-alvo do H1N1 2009 detectado.
   - SPC - NA (não aplicável); O SPC é ignorado devido a um alvo amplificado.
   - Probe Check - PASS (Verificação da sonda: Aprovada); todos os resultados de verificação da sonda são aprovados.

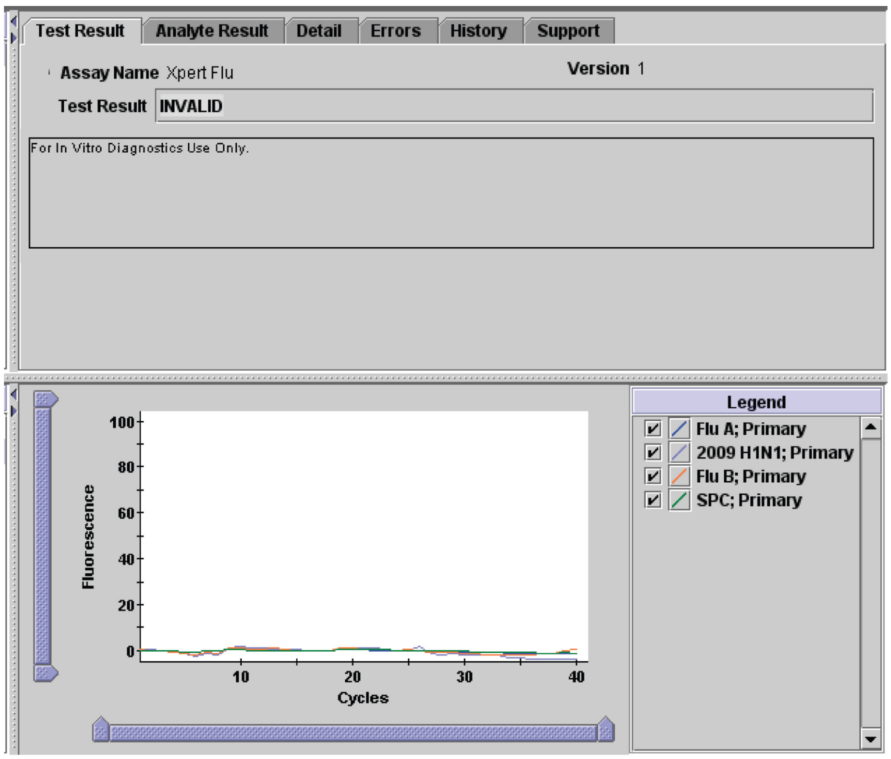


Figura 6. Exemplo de um resultado inválido (o SPC não cumpre os critérios de aceitação)

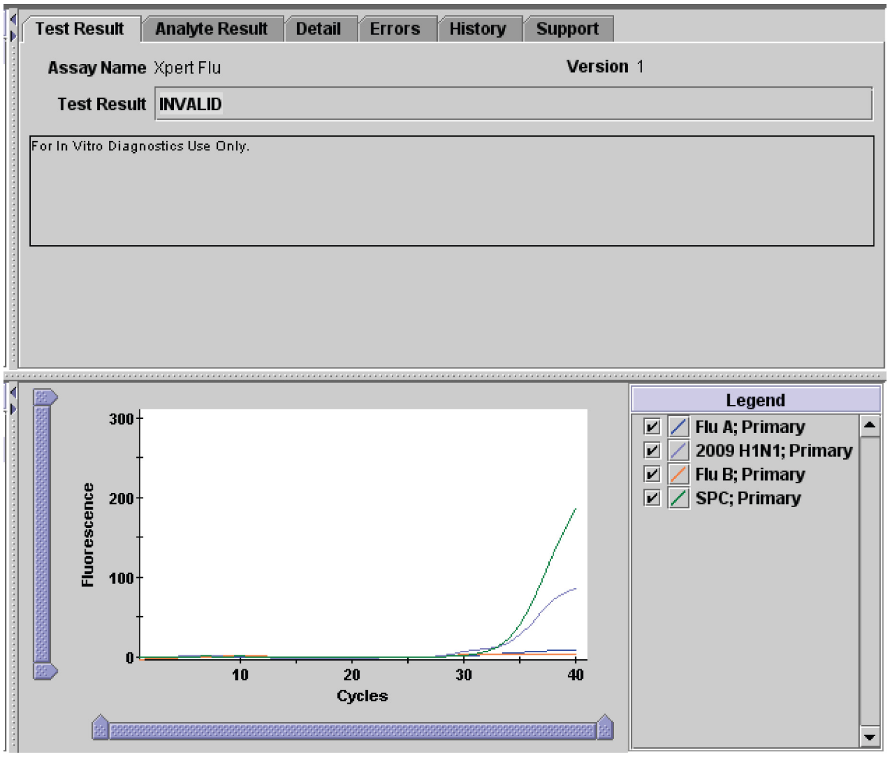


Figura 7. Exemplo de um resultado inválido (negativo para gripe A e positivo para H1N1 2009)

ERROR (Erro)

Não foi possível determinar a presença ou ausência de RNAs-alvo de gripe A, H1N1 2009 e gripe B. Repita o teste de acordo com as instruções da secção Procedimento de repetição do teste seguinte.

- 2009 H1N1 - NO RESULT (H1N1 2009 - Sem resultado)
- Flu A - NO RESULT (gripe A - sem resultado)
- Flu B - NO RESULT (gripe B - sem resultado)
- SPC - NO RESULT (SPC - sem resultado)
- Probe Check - FAIL (Verificação da sonda - Não aprovada)*; um ou todos os resultados da verificação da sonda falharam

* Se a verificação da sonda for aprovada, o erro é causado por um limite de pressão máxima excedido ou por uma falha de um componente do sistema.

NO RESULT (Sem resultado)

Não foi possível determinar a presença ou ausência de RNAs-alvo de gripe A, H1N1 2009 e gripe B. Repita o teste de acordo com as instruções da secção Procedimento de repetição de teste abaixo. NO RESULT (sem resultado) indica que os dados recolhidos foram insuficientes. Por exemplo, o operador parou um teste que estava a decorrer.

- 2009 H1N1 - NO RESULT (H1N1 2009 - sem resultado)
- Flu A - NO RESULT (gripe A - sem resultado)
- Flu B - NO RESULT (gripe B - sem resultado)
- SPC - NO RESULT (SPC - sem resultado)
- Probe Check - NA (Verificação da sonda - não aplicável)

Motivos para repetir um ensaio

Se ocorrer algum dos resultados de teste mencionados abaixo, repita o teste de acordo com as instruções da secção Procedimentos de repetição de teste, abaixo.

- Um resultado INVALID (Inválido) indica uma ou mais das seguintes situações:
  - O controlo SPC falhou;
  - O RNA-alvo da gripe A não foi detectado e o RNA-alvo do H1N1 2009 foi detectado;
  - A amostra não foi processada correctamente ou o PCR foi inibido.
- Uma mensagem ERROR (Erro) indica que o ensaio foi interrompido. Causas prováveis incluem: enchimento inadequado do tubo de reacção; foi detectado um problema de integridade da sonda; ou foi excedido o limite máximo da pressão.
- NO RESULT (sem resultado) indica que os dados recolhidos foram insuficientes. Por exemplo, o operador parou um teste que estava a decorrer ou ocorreu uma falha de energia.

Procedimento de repetição de teste

Para repetir o teste de um resultado indeterminado, utilize um novo cartucho (não reutilize o cartucho) e reagentes novos.

Para zaragatoas nasofaríngeas (NP) utilize 300 µl da amostra restante do tubo UTM original.

Para aspirados/lavagens nasais (NA/W) utilize 300 µl da amostra diluída restante do tubo UTM de 3 ml.

1. Retire um cartucho novo da embalagem.
2. Misture a amostra invertendo o tubo cinco vezes.
3. Abra a tampa do cartucho. Utilizando uma pipeta de transferência limpa de 300 µl (fornecida), transfira 300µl da amostra para a câmara "S" do cartucho.
4. Coloque o reagente de fixação 1 na câmara 1 do cartucho. Esprema a ampola até que o conteúdo inteiro seja adicionado ao cartucho.
5. Feche a tampa do cartucho.

Limitações

- O desempenho do Ensaio Xpert Flu foi validado utilizando apenas os procedimentos fornecidos neste folheto. Qualquer modificação destes procedimentos pode alterar o desempenho do teste.
- Os resultados do Ensaio Xpert Flu devem ser interpretados com outros dados laboratoriais e clínicos à disposição do médico.
- Podem ocorrer resultados de teste errados devido a colheita de amostra incorrecta, incumprimento dos procedimentos recomendados para colheita, manuseamento e conservação da amostra, erro técnico, troca de amostras ou porque o número de organismos na amostra está abaixo do limite de detecção do teste. O cumprimento cuidadoso das instruções deste folheto é necessário para evitar resultados errados.
- Amostras extremamente viscosas, em resultado da adição de 1,5% (p/v) e 2,5% (p/v) de mucina apresentaram resultados de teste falso-negativos com o Ensaio Xpert Flu. A inibição do Ensaio Xpert Flu foi também observada com a adição de 1% (p/v) de mucina, resultando numa detecção retardada do Influenza A, Influenza A subtipo H1N1 2009 e Influenza B.

Características de desempenho

Desempenho clínico

As características de desempenho do Ensaio Xpert Flu em amostras arquivadas foram avaliadas em duas instituições nos EUA.

Os participantes incluíram indivíduos cujos cuidados de saúde de rotina implicavam a recolha de aspirados/lavagens nasais (NA/W) ou amostras de zaragatoas nasofaríngeas para teste do vírus influenza. Para os participantes elegíveis, as alíquotas de amostra restante foram obtidas para o teste com o Ensaio Xpert Flu e testes de referência.

O desempenho do Ensaio Xpert Flu foi calculado com base nos resultados dos testes de referência (p. ex.: cultura viral, seguida de um ensaio sob fluorescência directa (DFA), com confirmação sequencial de todas as amostras positivas para o influenza A), para as amostras nas quais a cultura viral foi efectuada antes do congelamento. Nas amostras em que a cultura viral não foi efectuada antes do congelamento, o desempenho do Ensaio Xpert Flu foi determinado com base no Ensaio Prodesse ProFlu+™ e confirmações sequenciais. Todas as amostras positivas para o Influenza A, identificadas pela cultura viral ou pelo Ensaio ProFlu+, são testadas em sequência para diferenciar o Influenza A e o H1N1 2009 de outros subtipos de Influenza A.

Resultados totais

Um total de 270 zaragatoas de amostras nasofaríngeas (NP) arquivadas foram testadas para o influenza A, influenza A subtipo H1N1 2009 e influenza B através do Ensaio Xpert Flu e de cultura. No total, 357 amostras de aspirados/lavagens nasais (NA/W) arquivadas foram testadas para o influenza A, influenza A subtipo H1N1 2009 e influenza B através do Ensaio Xpert Flu e ProFlu+. Todas as amostras positivas para o Influenza A, identificadas pela cultura viral ou pelo Ensaio ProFlu+, foram testadas em sequência para diferenciar o Influenza A e o H1N1 2009 de outros subtipos de Influenza A.

Com as zaragatoas nasofaríngeas (NP), o Ensaio Xpert Flu demonstrou uma sensibilidade e especificidade para a detecção do influenza A de 97,5% e 100% respectivamente, com base na cultura viral seguida de ensaio sob fluorescência directa (DFA), com a confirmação sequencial de todos os isolados positivos para influenza A (Tabela 1). A sensibilidade e especificidade do Ensaio Xpert Flu para detecção do influenza A, subtipo H1N1 2009 com as zaragatoas nasofaríngeas foi de 100% e 100%, respectivamente (Tabela 2). A sensibilidade e especificidade do Ensaio Xpert Flu para detecção do influenza B com as zaragatoas nasofaríngeas foi de 93,8% e 99,6%, respectivamente (Tabela 3).

Tabela 1. Desempenho do Ensaio Xpert Flu vs. Método de Referência com Zaragatoas Nasofaríngeas (NP) – Influenza A

		Cultura Viral + DFA		
		Pos.	**Neg.**	**Total**
Ensaio Xpert Flu	**Pos.**	115	0	115
	Neg.	3	152	155
	Total	118	152	270

Sensibilidade:	97,5% (IC de 95%: 92.8-99.5)
Especificidade:	100% (IC de 95%: 97.6-100)
Precisão:	98,9% (IC de 95%: 96.8-99.8)
VPP:	100% (IC de 95%: 96.8-100)
VPN:	98,1% (IC de 95%: 94.5-99.6)

Tabela 2. Desempenho do Ensaio Xpert Flu vs. Método de Referência com Zaragatoas Nasofaríngeas (NP) – H1N1 2009

		Cultura Viral + DFA/Confirmações sequenciais		
		Pos.	**Neg.**	**Total**
Ensaio Xpert Flu	**Pos.**	85	0	85
	Neg.	0	182	182
	Total	85	182	267

Sensibilidade:	100% (IC de 95%: 95.6-100)
Especificidade:	100% (IC de 95%: 98.0-100)
Precisão:	100% (IC de 95%: 98.6-100)
VPP:	100% (IC de 95%: 95.6-100)
VPN:	100% (IC de 95%: 98.0-100)

Tabela 3. Desempenho do Ensaio Xpert Flu vs. Método de Referência com Zaragatoas Nasofaríngeas (NP) – Influenza B

	Cultura Viral + DFA			
Ensaio Xpert Flu		**Pos.**	**Neg.**	**Total**
	Pos.	30	1	31
	Neg.	2	237	239
	Total	32	238	270

Sensibilidade:	93,8% (IC de 95%: 79.2-99.2)
Especificidade:	99,6% (IC de 95%: 97.7-100)
Precisão:	98,9% (IC de 95%: 96.8-99.8)
VPP:	96,8% (IC de 95%: 83.3-99.9)
VPN:	99,2% (IC de 95%: 97.0-99.9)

Com base no Ensaio ProFlu+, com confirmação sequencial de todos os isolados positivos para influenza A, o Ensaio Xpert Flu identificou 99,2% das amostras de aspirados/lavagens nasais (NA/W) como sendo positivas para o influenza A e 100% das amostras negativas para o influenza A (Tabela 4). O Ensaio Xpert Flu identificou 97,9% de amostras de aspirados/lavagens nasais (NA/W) como sendo positivas para o influenza A, subtipo H1N1 2009 e 100% de amostras negativas para o influenza A, subtipo H1N1 2009 (Tabela 5). O Ensaio Xpert Flu identificou 100% de amostras de aspirados/lavagens nasais (NA/W) como sendo positivas para o influenza B e 100% de amostras negativas para o influenza B (Tabela 6).

Tabela 4. Desempenho do Ensaio Xpert Flu A Panel vs. Método de Referência com Amostras de Aspirados/Lavagens Nasais (NA/W) – Influenza A

	ProFlu+			
Ensaio Xpert Flu		**Pos.**	**Neg.**	**Total**
	Pos.	125	0	125
	Neg.	1	231	232
	Total	126	231	357

Sensibilidade:	99,2% (IC de 95%: 95.7-100)
Especificidade:	100% (IC de 95%: 98.4-100)
Precisão:	99,7% (IC de 95%: 98.5-100)
VPP:	100% (IC de 95%: 97.1-100)
VPN:	99,6% (IC de 95%: 97.6-100)

Tabela 5. Desempenho do Ensaio Xpert Flu A Panel vs. Método de Referência com Amostras de Aspirados/Lavagens Nasais (NA/W) – H1N1 2009

		ProFlu+/Confirmações sequenciais		
		Pos.	**Neg.**	**Total**
Ensaio Xpert Flu	**Pos.**	94	0	94
	Neg.	2	261	263
	Total	96	261	357
		Sensibilidade:	97,9% (IC de 95%: 92.7-99.8)	
		Especificidade:	100% (IC de 95%: 98.6-100)	
		Precisão:	99,4% (IC de 95%: 98.0-99.9)	
		VPP:	100% (IC de 95%: 96.1-100)	
		VPN:	99,2% (IC de 95%: 98.6-100)	

Tabela 6. Desempenho do Ensaio Xpert Flu A Panel vs. Método de Referência com Amostras de Aspirados/Lavagens Nasais (NA/W) – Influenza B

		ProFlu+		
		Pos.	**Neg.**	**Total**
Ensaio Xpert Flu	**Pos.**	40	0	40
	Neg.	0	317	317
	Total	40	317	357
		Sensibilidade:	100% (IC de 95%: 91.2-100)	
		Especificidade:	100% (IC de 95%: 98.8-100)	
		Precisão:	100% (IC de 95%: 99.0-100)	
		VPP:	100% (IC de 95%: 91.2-100)	
		VPN:	100% (IC de 95%: 98.8-100)	

Durante os testes com os Ensaios Xpert Flu efectuados com amostras de zaragatoas nasofaríngeas (NP) elegíveis, 98,9% (267/270) daquelas amostras foram bem sucedidas à primeira tentativa. As restantes 3 apresentaram resultados indeterminados na primeira tentativa (1 INVALID (inválida) e 2 ERROR (erro)). À segunda tentativa, todas as 3 amostras apresentaram resultados. Durante os testes com os Ensaios Xpert Flu efectuados com amostras de aspirados/lavagens nasais (NA/W) elegíveis, 95,5% (342/358) foram bem sucedidas à primeira tentativa. As restantes 16 apresentaram resultados indeterminados na primeira tentativa (4 INVALID (inválido), 11 ERROR (erro) e 1 NO RESULT (sem resultado)). À segunda tentativa, 15 das 16 amostras apresentaram resultados.

Desempenho analítico

Sensibilidade analítica (limite de detecção)

Foram realizados estudos para determinar os intervalos de confiança de 95% para o limite de detecção (LoD) analítico de 2 estirpes de Influenza A sazonal (H1N1), 2 de Influenza A sazonal (H3N2), 5 de Influenza A subtipo H1N1 2009 e 2 de Influenza B diluídas numa matriz de substituto nasofaríngea. A matriz de substituto era composta por 1% de sangue humano, 2,5% de mucina e 0,85% de cloreto de sódio. O limite de detecção é definido como a concentração mais baixa (dose infecciosa de cultura de tecido $(DICT)_{50}$/ml) por amostra que pode ser distinguida com reprodutibilidade das amostras negativas, com confiança de 95%, ou a concentração mais baixa na qual 19 das 20 réplicas são positivas. Cada estirpe foi testada em réplicas com uma concentração de vírus de 20%.

Os intervalos de estimativa e confiança foram determinados utilizando regressão logística com dados (número de resultados positivos por número de réplicas, em cada nível), ao longo do intervalo de concentrações testadas. Os intervalos de confiança foram determinados utilizando estimativas de máxima probabilidade sobre os parâmetros do modelo logístico, utilizando a matriz de variância-covariância. As estimativas do ponto de limite de detecção (LoD) e os intervalos de confiança de 95% superior e inferior para cada estirpe encontram-se resumidos nas tabelas 7 até 10.

Tabela 7. Intervalos de Confiança de 95% para o Limite de Detecção (LoD) Analítico – Influenza A Sazonal H1N1

ID da Estirpe – Influenza A H1N1	95% inferior CI	LoD ($DICT_{50}$/ml)	Superior 95% CI
Influenza A/H1/Brisbane/59/07	1.0	1.3	1.9
Influenza A/H1/Nova Caledónia/20/1999	5.9	7.3	11.7

Tabela 8. Intervalos de Confiança de 95% para o Limite de Detecção (LoD) Analítico – Influenza A Sazonal H3N2

ID da Estirpe – Influenza A H3N2	95% inferior CI	LoD ($DICT_{50}$/ml)	Superior 95% CI
Influenza A/H3/Brisbane/10/07	2.1	2.5	3.3
Influenza A/H3/Wisconsin/67/05	5.0	5.9	7.9

Tabela 9. Intervalos de Confiança de 95% para o Limite de Detecção (LoD) Analítico – Influenza A H1N1 2009

ID da Estirpe – H1N1 2009	95% inferior CI	LoD ($DICT_{50}$/ml)	Superior 95% CI
Influenza A/Suína Nova Iorque/01/2009	1.1	1.4	2.1
Influenza A/Suína Nova Iorque/02/2009	4.0	4.8	7.3
Influenza A/Suína Nova Iorque/03/2009	3.3	3.5	4.1
Influenza A/Canadá/6294	66.3	77.1	105.4
Influenza A/WI/629-S1/2009	15.0	16.2	19.1

Tabela 10. Intervalos de confiança de 95% para o limite de detecção (LoD) analítico – Influenza B

ID da Estirpe – Influenza A H1N1	95% inferior CI	LoD ($DICT_{50}$/ml)	Superior 95% CI
Influenza B/Flórida/02/06	1.2	1.5	2.2
Influenza B/Flórida/07/04	41.3	50.6	72.9

Especificidade analítica (reactividade cruzada)

A especificidade analítica do Ensaio Xpert Flu foi avaliada testando um painel de 40 culturas composto por 18 estirpes virais, 21 estirpes bacterianas e 1 estirpe de levedura, representantes dos patogénios respiratórios comuns ou dos potencialmente encontrados no tracto nasofaríngeo. Três réplicas de todas as estirpes bacterianas e de levedura foram testadas em concentrações de $\geq 10^6$ UFC/ml. Três réplicas de todos os vírus foram testadas em concentrações de $\geq 10^4$ $DICT_{50}$/ml. Foram incluídos controlos positivos e negativos no estudo. A especificidade analítica foi de 100%. Os resultados encontram-se na Tabela 11.

Tabela 11. Especificidade analítica do Ensaio Xpert Flu

Estirpe	Concentração (por cartucho)	Influenza A	Influenza A H1N1 2009	Influenza B
Controlo positivo 1 - Influenza A/Influenza B	Não aplicável	+	-	+
Controlo positivo 2 - Influenza A H1N1 2009	Não aplicável	+	+	-
Controlo negativo	Não aplicável	-	-	-
Adenovírus Tipo 7A	1×10^6 $DICT_{50}$/ml	-	-	-
Adenovírus Tipo 1	1×10^6 $DICT_{50}$/ml	-	-	-
Coronavírus humano 229E	1×10^6 $DICT_{50}$/ml	-	-	-
Coronavírus humano OC43	1×10^4 $DICT_{50}$/ml	-	-	-
Citomegalovírus*	1×10^5 cópias/ml	-	-	-
Enterovírus Tipo 71	1×10^6 $DICT_{50}$/ml	-	-	-
Vírus Epstein-Barr	1×10^5 $DICT_{50}$/ml	-	-	-
Vírus parainfluenza Tipo 1	1×10^5 $DICT_{50}$/ml	-	-	-
Vírus parainfluenza Tipo 2	1×10^6 $DICT_{50}$/ml	-	-	-
Vírus parainfluenza Tipo 3	1×10^6 $DICT_{50}$/ml	-	-	-
Vírus do sarampo	1×10^6 $DICT_{50}$/ml	-	-	-
Metapneumovírus humano	1×10^6 $DICT_{50}$/ml	-	-	-
Vírus da parotidite	1×10^6 $DICT_{50}$/ml	-	-	-
Vírus sincicial respiratório A	1×10^6 $DICT_{50}$/ml	-	-	-
Vírus sincicial respiratório B	1×10^6 $DICT_{50}$/ml	-	-	-
Vírus herpes simplex humano Tipo 1	1×10^6 $DICT_{50}$/ml	-	-	-
Rhinovírus humano Tipo 4	1×10^6 $DICT_{50}$/ml	-	-	-
Ecovírus 11	1×10^6 $DICT_{50}$/ml	-	-	-
*Bordetella pertussis**	1×10^6 cópias/ml	-	-	-
Chlamydia pneumoniae	1×10^6 UFC/ml	-	-	-
Corynebacterium xerosis	1×10^6 UFC/ml	-	-	-
Escherichia coli	1×10^6 UFC/ml	-	-	-
Proteus vulgaris	1×10^6 UFC/ml	-	-	-
Proteus mirabilis	1×10^6 UFC/ml	-	-	-
Klebsiella pneumoniae	1×10^6 UFC/ml	-	-	-
Haemophilus influenzae	1×10^6 cópias/ml	-	-	-
Lactobacillus crispatus	1×10^6 UFC/ml	-	-	-
Legionella pneumophila	1×10^6 UFC/ml	-	-	-
Moraxella catarrhalis	1×10^6 UFC/ml	-	-	-
Mycobacterium tuberculosis (estirpe de BCG)	1×10^6 UFC/ml	-	-	-
Mycoplasma pneumoniae	1×10^6 UFC/ml	-	-	-
Neisseria meningitides	1×10^6 UFC/ml	-	-	-
Neisseria Cinneria	1×10^6 UFC/ml	-	-	-
Pseudomonas aeruginosa	1×10^6 UFC/ml	-	-	-
Staphylococcus aureus	1×10^6 UFC/ml	-	-	-
Staphylococcus epidermidis	1×10^6 UFC/ml	-	-	-
Streptococcus pneumoniae	1×10^6 UFC/ml	-	-	-
Streptococcus pyogenes	1×10^6 UFC/ml	-	-	-
Streptococcus salivarius	1×10^6 UFC/ml	-	-	-
Candida albicans	1×10^6 UFC/ml	-	-	-

*O ácido nucleico foi testado para o Citomegalovírus e Bordetella pertussis.

Reactividade analítica (inclusividade)

A reactividade analítica do Ensaio Xpert Flu foi avaliada contra múltiplas estirpes de Influenza A (subtipos H1N1, H3N2, H5N2, H5N1 e H7N3), Influenza A H1N1 2009 e Influenza B. Nestes, foram incluídos o Influenza A subtipo H1N1 (12), Influenza A subtipo H3N2 (7), Influenza A subtipo H1N1 2009 (6), Influenza A subtipo H5N1 (1), Influenza A subtipo H5N2 (1), Influenza A subtipo H7N3 (1) e Influenza B (11). Três réplicas de cada uma das estirpes virais foram testadas com uma dose infecciosa de cultura de tecido (DICT) de 5 - 500_{50}/ml. Os resultados encontram-se em Tabela 12.

Tabela 12. Reactividade analítica (inclusividade) do Ensaio Xpert Flu

Estirpe viral	Concentração ($DICT_{50}$/ml)	Influenza A	Influenza A H1N1 2009	Influenza B
Influenza A/Denver/1/57 (H1N1)	500	+	-	-
Influenza A/Nova Iorque/55/2004 (H1N1)	500	+	-	-
Influenza A/Mal/302/54 (H1N1)	50	+	-	-
Influenza A/Nova Jérsia/8/76 (H1N1)	500	+	-	-
Influenza A/NWS/33 (H1N1)	5	+	-	-
Influenza A/PR/8/34 (H1N1)	500	+	-	-
Influenza A/Taiwan/42/06 (H1N1)	500	+	-	-
Influenza A/WS/33 (H1N1)	5	+	-	-
Influenza A/Suína/1976/31 (H1N1 Suína)	500*	+	-	-
Influenza A/Suína/Iowa/15/30 (H1N1 Suína)	500*	+	-	-
Influenza A/Brisbane/59/07 (H1N1)	5	+	-	-
Influenza A/Nova Caledónia/20/1999 (H1N1)	50	+	-	-
Influenza A/Victoria/3/75 (H3N2)	500	+	-	-
Influenza A/Aichi2/68 (H3N2)	500	+	-	-
Influenza A/Hong Kong/8/68 (H3N2)	50	+	-	-
Influenza A/Havai/15/2001 (H3N2)	500	+	-	-
Influenza A/Port Chalmers/1/73 (H3N2)	500	+	-	-
Influenza A/Brisbane/10/07 (H3N2)	10	+	-	-
Influenza A/Wisconsin/67/05 (H3N2)	10	+	-	-
Influenza A/Suína Nova Iorque/01/2009 (H1N1 2009)	10	+	+	-
Influenza A/Suína Nova Iorque/02/2009 (H1N1 2009)	100	+	+	-
Influenza A/Suína Nova Iorque/03/2009 (H1N1 2009)	10	+	+	-
Influenza A/Califórnia/4/2009 (H1N1 2009)	5	+	+	-
Influenza A/Canadá/6294 (H1N1 2009)	500	+	+	-
Influenza A/WI/929-S1 (H1N1 2009)	100	+	+	-
Influenza A/Mallard/WI/34/75 (H5N2)	3 pg/µl^^	+	-	-
Influenza A/Anhui/02/2005/PR8-IBCDC-RG5 (H5N1)	0,122 pg/µl^^	+	-	-
Influenza A/galinhas/NJ/15086-3/94 (H7N3)	5 pg/µl^^	+	-	-
Influenza B/Allen/45	500	-	-	+
Influenza B/Flórida/02/06	10	-	-	+
Influenza B/Flórida/04/06	500	-	-	+
Influenza B/Flórida/07/04	50	-	-	+
Influenza B/GL/1739/54	500	-	-	+
Influenza B/Hong Kong/5/72	500	-	-	+
Influenza B/Lee/40	500	-	-	+
Influenza B/Malásia/2506/04	500	-	-	+
Influenza B/Maryland/1/59	500	-	-	+
Influenza B/Panamá/45/90	500	-	-	+
Influenza B/Taiwan/2/62	50^	-	-	+

* Concentração expressa em PFU/ml; ^concentração expressa como 50/ml CEID; ^^concentração expressa em picogramas/µl.

Estudo de substâncias interferentes

Num estudo não clínico, as substâncias potencialmente interferentes que poderão estar presentes no tracto nasofaríngeo foram avaliadas directamente com base no desempenho do Ensaio Xpert Flu. As substâncias exógenas potencialmente interferentes presentes no tracto nasofaríngeo podem incluir, entre outras: sangue, secreções nasais ou muco e medicamentos para as vias nasais e garganta utilizados para aliviar a congestão, secura e irritação nasal, ou asma e sintomas alérgicos. Estas substâncias estão enumeradas na Tabela 13 com ingredientes activos e nas concentrações testadas abaixo. Amostras extremamente viscosas, em resultado da adição de 1,5% (p/v) e 2,5% (p/v) de mucina apresentaram resultados de teste falso-negativos com o Ensaio Xpert Flu. A inibição do Ensaio Xpert Flu foi também observada com a adição de 1% (p/v) de mucina, resultando numa detecção retardada do Influenza A, Influenza A subtipo H1N1 2009 e Influenza B.

Tabela 13. Substâncias potencialmente interferentes com o Ensaio Xpert Flu

Substância	Descrição/Ingrediente activo	Concentração testada
Sangue (humano)	Não aplicável	2% (v/v)
Mucina	Proteína de mucina purificada (glândula submaxilar bovina ou suína)	2,5%, 1,5%, 1% e 0,5% (p/v)
Gotas nasais Neo-Synephrine®	Fenilefrina HCI	15% (v/v)
Spray nasal de epinefrina	Cloridrato de oximetazolina	15% (v/v)
Gel nasal Zicam®	Luffa opperculata, Galphimia glauca, Histaminum hydrochloricum Sulfur	5% (v/v)
Spray nasal salino	Cloreto de sódio com conservantes	15% (v/v)
Antibiótico, pomada nasal	Mupirocina	10 mg/ml
Anti-bacteriano, sistémico	Tobramicina	4,0 µg/ml
Pastilhas para a garganta, anestésico e analgésico oral	Mentol	1,7 mg/ml de mentol

Estudo de contaminação por "carry-over"

Foi realizado um estudo para demonstrar que os cartuchos GeneXpert de utilização única e autónomos impedem a contaminação por "carry-over" durante o ensaio de amostras negativas após a presença de amostras altamente positivas no mesmo módulo GeneXpert. O estudo consistiu numa amostra negativa processada no mesmo módulo GeneXpert, imediatamente a seguir a uma amostra com grande concentração de Influenza A subtipo H1N1 2009 (aproximadamente 10^6 $DICT_{50}$/teste) ou amostra de Influenza B (aproximadamente 10^6 $DICT_{50}$/teste). Este esquema de teste foi repetido 20 vezes em 4 módulos GeneXpert, para um total de 88 testes, resultando em 40 amostras positivas e 48 amostras negativas. Todas as 40 amostras positivas foram correctamente identificadas como positivas para o Influenza A H1N1 2009 ou positivas para o Influenza B. Todas as 48 amostras negativas foram correctamente identificadas como negativas para a Gripe A, não detectadas para o H1N1 2009 e negativas para a Gripe B.

Reprodutibilidade

Um painel com 10 amostras com concentrações variáveis de influenza A, influenza B e influenza A subtipo H1N1 2009 foi testado em duplicado, em 10 dias diferentes, em cada um dos 3 locais diferentes (10 amostras × 2 vezes ao dia × 10 dias × 3 locais). Foi utilizado um lote de Ensaio Xpert Flu em cada um dos 3 locais de teste. Os Ensaios Xpert Flu foram realizados de acordo com o procedimento de ensaio Xpert Flu. Os resultados encontram-se resumidos em Tabela 14.

Tabela 14. Resumo dos resultados de reprodutibilidade[a]

ID de amostra	Local 1	Local 2	Local 4	% de concordância total por amostra
Negativo	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (60/60)
Gripe A positivo moderado	100% (20/20)	100% (19/19)[b]	100% (20/20)	100% (59/59)
Gripe A positivo fraco	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (60/60)
Gripe A negativo forte	100% (20/20)	95.0% (19/20)	90% (18/20)	95.0% (57/60)
H1N1 2009 positivo moderado	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (60/60)
H1N1 2009 positivo fraco	100% (20/20)	100% (19/19)[a]	100% (20/20)	100% (59/59)
H1N1 2009 negativo forte	94.7% (18/19)[b]	100% (20/20)	89.5% (17/19)[b]	94.8% (55/58)[c]
Gripe B positivo moderado	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (60/60)
Gripe B positivo fraco	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (60/60)
Gripe B negativo forte	90.0% (18/20)	95.0% (19/20)	55.0% (11/20)	80.0% (48/60)
% de concordância total	98.5% (196/199)	99.0% (196/198)	93.5% (186/199)	97.0% (578/596)

[a] n=19 porque uma amostra produziu resultados indeterminados e não foi novamente testada.
[b] n=19 porque a repetição produziu um resultado indeterminado.
[c] 9/55 amostras negativas para o H1N1 2009 resultaram numa identificação positiva válida para Gripe A, uma vez que o sinal de Gripe A foi detectado. Uma identificação positiva válida para o H1N1 2009 requer
a detecção de ambos os sinais de Gripe A e H1N1 2009.

Referências

1. Petric M, Comanor L, Petti CA. Role of the laboratory in diagnosis of influenza during seasonal epidemics and potential pandemics. J Infect Dis. 2006;194:S98-110.

2. Schweiger B, Zadow I, Heckler R, et al. Application of a fluorogenic PCR assay for typing and subtyping of influenza viruses in respiratory samples. J Clin Micro. 2000;38:1552-1558.

3. http://www.cdc.gov - Acedido a 22 Fevereiro de 2010.

4. Centers for Disease Control and Prevention. Biosafety in Microbiological and Biomedical laboratories. Richmond JY and McKinney RW (eds) (1993). HHS Publication number (CDC) 93-8395.

5. Interim Biosafety Guidance for All Individuals Handling Clinical Specimens or Isolates Containing 2009-H1N1 Influenza A Virus (Novel H1N1), including Vaccine Strains, 15 de Agosto de 2009; (http://www.cdc.gov/h1n1flu/guidelines_labworkers.htm).

6. Clinical and Laboratory Standards Institute (anteriormente National Committee for Clinical Laboratory Standards). Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline. Documento M29 (refere-se à edição mais recente).

Assistência

Para obter assistência, contacte a Cepheid através de um dos contactos a seguir fornecidos. Certifique-se de que indica o número de série do instrumento e a ID do lote de reagente quando efectuar um contacto telefónico ou quando enviar uma mensagem de correio electrónico.

América do Norte

Para obter apoio técnico, utilize as seguintes informações de contacto:

Tel.: +1.888.838.3222

E-mail: techsupport@cepheid.com

Pode contactar o Apoio Técnico Cepheid através do telefone, de 2.ª a 6.ª feira, das 5h às 17h (hora do Pacífico).

União Europeia

Para obter apoio técnico, utilize as seguintes informações de contacto:

Tel.: +33.563.82.53.19

Fax: +33.563.82.53.01

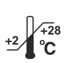
E-mail: techsupport@cepheideurope.fr

Outras localizações

Contacte o representante Cepheid da sua área.

Tabela de símbolos

Tabela 15. Significado dos símbolos

Símbolo	Significado
REF	Referência
IVD	Dispositivo médico para diagnóstico *in vitro*
	Não re-utilizar
	Fabricante
	Conteúdo suficiente para <n> testes
CONTROL	Controlo
EC REP	Representante autorizado na União Europeia
	Limites de temperatura
	Risco biológico

Fabricante

Cepheid
904 Caribbean Drive
Sunnyvale, CA 94089-1189

Telefone: +1.408.541.4191
Fax: +1.408.541.4192

EC REP Representante autorizado

Cepheid Europe
Vira-Solelh
81470 Maurens-Scopont
França

Tel.: +33.563.82.53.00
Fax: +33.563.82.53.01
E-mail: cepheid@cepheideurope.fr

CE IVD